

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2* στις ρίζες του μοντέλου-φυτού *Lotus japonicus* και η επίδρασή του στη φυματιογένεση

Overexpression of *LjAMY2* gene in *Lotus japonicus* roots-Effect on nodulation

ΝΤΟΥΠΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

Τριμελής επιτροπή:

- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη:**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- **Καρπούζας Δημήτριος:**
Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας
- **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος:**
Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Σας ευχαριστώ πολύ για τις χρήσιμες συμβουλές σας, καθώς και για την πολύτιμη και ουσιαστική επιστημονική καθοδήγηση που μου δώσατε.

Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη για την ουσιώδη βοήθεια που μου έδωσε απλόχερα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την τεράστια υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμα, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους αλλά και για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που μου προσέφεραν.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την απεριόριστη στήριξη και αγάπη τους αυτά τα χρόνια. Όλα τα ευχαριστώ του κόσμου είναι λίγα για αυτούς τους ανθρώπους. Κυρίως τους ευχαριστώ που πίστεψαν σε μένα και με παρακινούσαν συνεχώς να ξεπερνάω τα όρια μου, να κάνω υπερβάσεις και να βελτιώνομαι.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον αδερφό μου Αλέξανδρο, για όλη του την υπομονή αλλά και την βοήθεια που μου προσέφερε.

“The important thing is to never stop questioning”

Albert Einstein

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Σκοπός.....	9
1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	9
1.3 Τερπένια.....	11
1.4 Οι δύο οδοί βιοσύνθεσης τερπενίων.....	12
1.5 Παραγωγή τριτερπενίων.....	14
1.6 Παραγωγή β-αμυρίνης και λουπεόλης από OSCs.....	16
1.7 Λειτουργίες β-αμυρίνης και λουπεόλης.....	19
1.8 Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i>	20
1.9 Γονιδιακές συστοιχίες(Gene clusters).....	21
1.10 Μετασχηματισμός με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και “Hairy root” φαινότυπος.....	23
1.11 Φυματιογένεση.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Απολύμανση σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	27
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης των σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	27
2.3 Απομόνωση DNA με την χρήση διαλύματος CTAB από ιστούς ρίζας.....	28
2.4 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση της μεθόδου Qubit® (Thermo Fisher Scientific).....	28
2.5 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).....	29
2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.....	33
2.7 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	33
2.8 Διαγνωστικές πέψεις πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	34
2.9 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων του στελέχους <i>A.rhizogenes</i> LBA1334 και άμεσος μετασχηματισμός αυτών με το φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2.....	35
2.10 Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου AMY2 μέσω του συστήματος Gateway cloning® (Thermo Fisher Scientific).....	36
2.11 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	38
2.12 Hairy-roots μετασχηματισμός του φυτού <i>Lotus japonicus</i> διαμεσολαβούμενος από την παρουσία <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA1334.....	39
2.13 Μόλυνση των μετασχηματισμένων φυτών <i>Lotus japonicus</i> με το ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i> R7A.....	42
2.14 Απομόνωση RNA με LiCl.....	42
2.15 Πειράματα RT-qPCR (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου).....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Απομόνωση και ενίσχυση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου AMY2 μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	45

3.2 Κατασκευή φορέα υπερέκφρασης του γονιδίου <i>AMY2</i> στο φυτό <i>Lotus japonicus</i> .	45
3.3 Hairy-roots μετασχηματισμός των φυτών <i>Lotus japonicus</i> με το στέλεχος <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA1334.....	49
3.4 Έλεγχος επιτυχούς μετασχηματισμού φυτών <i>Lotus japonicus</i>	50
3.5 Έλεγχος της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου <i>LjAMY2</i> σε θετικά μετασχηματισμένες ρίζες φυτών <i>L. japonicus</i>	52
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	73
6.1 Διαγράμματα.....	73
6.2 Κωδική αλληλουχία γονιδίου <i>AMY2</i>	74
6.3 Πλασμιδικοί χάρτες.....	75
6.4 Θρεπτικά διαλύματα.....	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια αποτελούν την κύρια ομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων, που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα μόρια αυτά συντίθενται από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου που καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs). Μεταξύ αυτών είναι και η συνθάση μικτής δράσης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LjAMY2* και καταλύει την σύνθεση δύο τριτερπενοϊδών ενώσεων, της αλκοόλης της β-αμυρίνης και ενός παραγωγού της λουπεόλης (το οποίο δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί δομικά), οι οποίες πιθανόν εμπλέκονται στην διαδικασία της φυματογένεσης των ψυχανθών. Αν και έχουν διεξαχθεί έρευνες πάνω στην συμμετοχή αυτών των δύο ενώσεων στη φυματογένεση, ο ρόλος τους στη διαδικασία αυτή δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2* στο φυτό *Lotus japonicus* και η επακόλουθη διερεύνηση του ρόλου του, στη φυματογένεση. Η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου ερευνήθηκε μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού λειτουργικών φυματίων. Αφού επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση του γονιδίου, ακολούθησε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός. Τα φυτά με βάση το πρότυπο υπερέκφρασης τους κατηγοριοποιήθηκαν σε φυτά με τεράστια και χαμηλή υπερέκφραση. Η φαινοτυπική τους σύγκριση με τα φυτά ελέγχου έδειξε ότι, και οι δύο ομάδες φυτών παρουσίαζαν σχεδόν διπλάσια αύξηση βάρους ρίζας, με τα φυτά με τεράστια υπερέκφραση να έχουν επίσης και μικρότερο αριθμό φυματίων από τα φυτά ελέγχου, ενώ τα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση να διαθέτουν και μεγαλύτερο μήκος ρίζας. Λόγω των παραπάνω προτείνεται ένας ρόλος των παραγώγων της συνθάσης μικτής δράσης τόσο στην αύξηση και ανάπτυξη της ρίζας, όσο και στην διαδικασία της φυματογένεσης. Τα φυτά με υπερέκφραση θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των περιεχομένων μεταβολιτών. Η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των παραγόμενων μεταβολιτών αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την καλύτερη κατανόηση των μεταβολικών οδών βιοσύνθεσης αυτών των ενώσεων, και της δράσης τους κατά την καθιέρωση συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ριζόβιων μικροοργανισμών και των ψυχανθών φυτών.

ABSTRACT

Triterpenes are the major group of the terpene superfamily, belonging to the secondary metabolites. These molecules are synthesized by the cyclization of 2,3-oxidosqualene catalyzed by enzymes known as oxidosqualene cyclases (OSCs). Among them is the mixed-function synthase, which is encoded by the *LjAMY2* gene and catalyzes the synthesis of two triterpenoids, the β -amyirin alcohol and a lupeol derivative (which has not yet been structurally characterized), which may be involved in legume nodulation. Although research has been conducted on the involvement of these two compounds in nodulation, their role in this process has not yet, been fully elucidated. The aim of the present study was to overexpress the *LjAMY2* gene in *Lotus japonicus* and to investigate its role in nodulation. The effect of the gene overexpression was investigated after the formation of functional nodules. After confirmation of gene overexpression, phenotypic characterization was followed. Plants based on their overexpression pattern were categorized into plants with high and low overexpression. Their phenotypic comparison with control plants showed that both groups of plants had almost twice as much root weight gain, with plants with enormous overexpression also having a smaller number of nodules than controls, whereas plants with low overexpression had larger root length as well. In view of the above, it is suggested a role of the derivatives of mixed function synthase in both root growth and development and in the nodulation process. Plants with overexpression will be used for metabolite analysis. Further investigation of the role of the metabolites produced, is a useful tool for a better understanding of the metabolic pathways of these compounds, and their action in establishing symbiotic interactions between root microorganisms and legumes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η προσπάθεια υπερέκφρασης του γονιδίου *LjAMY2* στο μοντέλο-φυτό *Lotus japonicus* και η επακόλουθη διερεύνηση του ρόλου του στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια συνθάση μικτής δράσης, που καταλύει τον σχηματισμό δύο δευτερογενών μεταβολιτών της β-αμυρίνης και ενός μεταβολίτη τύπου λουπένης.

Στο παρελθόν, είχε πραγματοποιηθεί αντίστοιχο πείραμα σίγησης του γονιδίου *LjAMY2* στο ίδιο φυτό, χωρίς να υπάρχει εμφανής επίδραση στην διαδικασία της φυματιογένεσης. Ωστόσο, καταγράφηκε η δημιουργία μιας πιο κοντής, με καθυστερημένη ανάπτυξη ρίζας έναντι των φυτών ελέγχου, προτείνοντας έτσι ένα ρόλο στην φυτική αύξηση και ανάπτυξη (Krokida *et al.*, 2013).

Συνεπώς, μια τέτοια έρευνα κρίνεται αναγκαία και χρήσιμη προκειμένου να διασαφηνιστεί ο ρόλος των παραγόμενων μεταβολιτών. Η διερεύνηση του ρόλου αυτών των μεταβολιτών αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την περαιτέρω κατανόηση των μεταβολικών οδών βιοσύνθεσης αυτών των ενώσεων, και της δράσης τους κατά την καθιέρωση συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ριζόβιων μικροοργανισμών και του φυτού *Lotus japonicus*.

Η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου ερευνήθηκε σε “hairy roots” μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού λειτουργικών φυματίων, 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν η επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση της υπερέκφρασης μέσω RT-qPCR, η εξωτερική μορφολογία των φυματίων, ο απόλυτος αριθμός των φυματίων, το μήκος και το βάρος της ρίζας καθώς και το μήκος του βλαστού σε φυτά μετασχηματισμένα με το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 που έφερε το φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2.

1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των τριτερπενοϊδών κατά την φυματιογένεση, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2*, μιας συνθάσης μικτής δράσης, που συνθέτει (στο φυτό *Lotus japonicus*) β-αμυρίνη και

ένα μεταβολίτη τύπου λουπένης, δύο ενώσεις με δράση δευτερογενών μεταβολιτών.

Τα φυτά παράγουν έναν μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή οργανικών ενώσεων, η δράση των οποίων δεν φαίνεται να συμβάλλει άμεσα στην επιβίωση υπό φυσιολογικές συνθήκες, δηλαδή στην φυσιολογική αύξηση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή ενός οργανισμού, λόγω της σποραδικής τους εμφάνισης και των διαφορών στην χημική τους σύσταση (Fraenkel, 1959). Οι ενώσεις αυτές αποτελούν προϊόντα των μεταβολικών διαδικασιών, έχουν χαμηλό μοριακό βάρος, και ο σχηματισμός τους είναι γενικά όργανο-, ιστό- και κύτταρο-ειδικός (Pagare *et al.*, 2015).

Ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες είναι αναγκαίοι στην επιβίωση του είδους, παίζοντας ενεργό ρόλο στη φωτοσύνθεση και την αναπνοή, η απουσία δευτερογενών μεταβολιτών δεν οδηγεί σε άμεσο θάνατο, αλλά σε μακροπρόθεσμη βλάβη της επιβίωσης του οργανισμού, που παίζει συχνά σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών (Agostini-Costa *et al.*, 1996). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο, καθώς ορισμένοι βρίσκονται μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε ομάδα συγγενικών ειδών σε αντίθεση με τους πρωτογενείς που απαντούν σ' όλο το φυτικό βασίλειο (Engelberth, 2013, p.444).

Σήμερα και έπειτα από την εκτεταμένη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι γνωστό ότι τα βιομόρια αυτά παίζουν κύριο ρόλο στην προσαρμογή των φυτών στο περιβάλλον (Verpoorte, 2000, p.1). Έχουν σημαντικές οικολογικές λειτουργίες στα φυτά διότι: προστατεύουν τα φυτά από καταπονήσεις, τόσο βιοτικές (βακτήρια, μύκητες, αμοιβάδες, έντομα, φυτά και μεγάλα ζώα) όσο και αβιοτικές (υψηλή θερμοκρασία και υγρασία, σκίαση, τραυματισμό ή παρουσία βαρέων μετάλλων) (Pagare *et al.*, 2001), λειτουργούν ως παράγοντες συμβίωσης μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών, παράγοντες ανταγωνισμού μεταξύ των φυτών (φαινόμενο αλληλοπάθειας) ενώ ορισμένοι διεγείρουν τον σχηματισμό των σπορίων, αναστέλλουν ή διεγείρουν τη βλάστηση και μπορούν να προσελκύσουν (μέσω χρωστικών και πτητικών ενώσεων) επικονιαστές και ζώα που συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων (Tiwari & Rana, 2015).

Το πιο ικανοποιητικό σύστημα για την ταξινόμηση των φυτικών συστατικών είναι σύμφωνα με τη βιογένεση ή τη βιοσυνθετική τους προέλευση (Harborne, 1999). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών σύμφωνα με τα βιοσυνθετικά τους μονοπάτια διακρίνονται σε τρεις χημικά διακριτές ομάδες (Agostini-Costa *et al.*, 1996):

➤ Οι φαινολικές ενώσεις (π.χ. φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, ταννίνες και φλαβονοειδή), αρωματικές δομές που φέρουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου και προέρχονται από τις βιοσυνθετικές οδούς του σικιμικού και του μηλονικού οξέος (Cheynier *et al.*, 2013).

➤ Οι αζωτούχες ενώσεις (π.χ. γλυκοσινόλες και αλκαλοειδή) που προέρχονται από αμινοξέα (Miyagawa, 2009).

➤ Τα τερπενοειδή (π.χ. καροτενοειδή και στερόλες), μια ετερογενής ομάδα λιποειδών που συντίθενται μέσω των βιοσυνθετικών οδών του μεβαλονικού οξέος και της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (Vranová *et al.*, 2012).

Στην παρούσα εργασία το υπό εξέταση γονίδιο *LjAMY2*, που κωδικοποιεί για μια συνθάση μικτής δράσης, εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των τερπενοειδών και πιο συγκεκριμένα των τριτερπενίων.

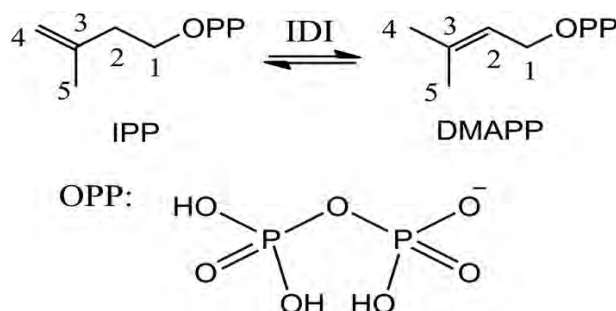
1.3 Τερπένια

Τα τερπένια ή αλλιώς τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή συγκροτούν την πιο λειτουργικά και δομικά ποικίλα ομάδα φυτικών μεταβολιτών που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα (Sacchettini & Poulter 1997; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013) ενώ έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχουν περισσότερες από 30.000 τερπενοειδής ενώσεις στα φυτά (Page *et al.*, 2004).

Τα τερπένια διαδραματίζουν ουσιώδεις ρόλους στα φυτά, καθώς λειτουργούν ως ορμόνες (αμπισικό οξύ, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες και βρασσινωστεροειδή), φωτοσυνθετικές χρωστικές (καροτενοειδή), φορείς ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα α, κινόνες, χλωροφύλλες), μεμβρανικά συστατικά (στεροειδή), ενώ επίσης συμμετέχουν στην επικοινωνία και την άμυνα, για παράδειγμα, ως αιθέρια έλαια (μονοτερπένια), χρώματα λουλουδιών (καροτενοειδή), προσελκυστικά εντόμων, φυτοαλεξίνες (σεσκι-, δι-, και τριτερπένια), αντιμικροβιακοί παράγοντες, αντιοξειδωτικά (μόνο-, σέσκιτερπένια) και παράγοντες που επηρεάζουν την συμβίωση με άλλα φυτά (Harborne, 1991; McGarvey & Croteau, 1995; Liu *et al.*, 2005).

Η εμπορική αξία αυτών των μεταβολιτών είναι σημαντική αφού χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως προσθετικά γεύσης, χρωστικές, πολυμερή ή φάρμακα (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013).

Με βάση τον κανόνα του ισοπρενίου (Ruzicka, 1953) όλα τα τερπένια παρά τη δομική και λειτουργική ποικιλομορφία μεταξύ τους προέρχονται από δύο πρόδρομα μόρια, πέντε ατόμων άνθρακα (C₅) το καθένα, το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του, το διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP), που καλούνται επίσης μονάδες ισοπρενίου (McGarvey & Croteau, 1995; ΕΙΚΟΝΑ 1).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Αναστρέψιμη ισομερίωση του IPP και του DMAPP, των βασικών δομικών ομάδων των τερπενίων. Συντομογραφίες: IDI: ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου/διφωσφορικού διμεθυλοαλλυλίου, IPP: διφωσφορικό ισοπεντενύλιο, DMAPP: διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο, OPP: πυροφωσφορική ομάδα. (από Hou *et al.*, 2017).

Σύμφωνα λοιπόν με τον αριθμό των μονάδων C₅ που περιέχουν τα τερπένια ταξινομούνται σε 7 κατηγορίες: ημιτερπένια(C₅), μονοτερπένια(C₁₀), σεσκιτερπένια(C₁₅), διτερπένια(C₂₀), τριτερπένια(C₃₀), τετρατερπένια(C₄₀) και πολυτερπένια([C₅]_n άτομα άνθρακα, όπου n>8) (Ruzicka, 1953; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002).

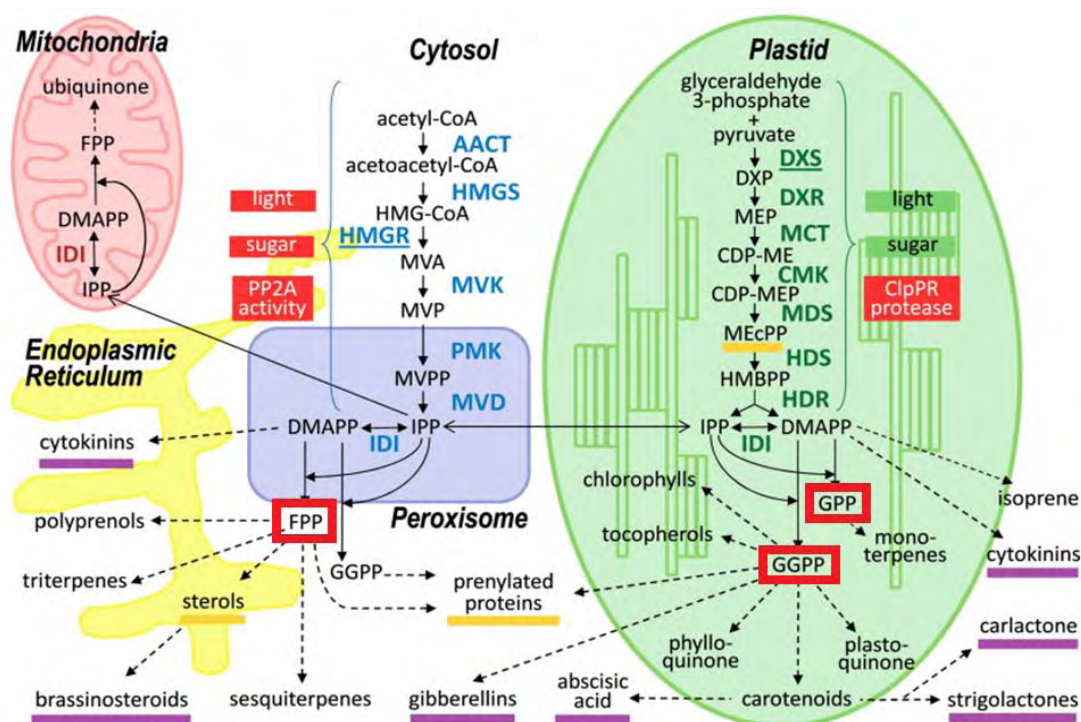
1.4 Οι δύο οδοί βιοσύνθεσης τερπενίων

Στα φυτά, δύο ανεξάρτητες οδοί που εντοπίζονται σε ξεχωριστά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των IPP και DMAPP (ΕΙΚΟΝΑ 2) (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Vranová *et al.*, 2012). Το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA) που εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στο υπεροξύσωμα και βιοσυνθέτει IPP/ DMAPP από τη συμπύκνωση του ακετυλο-CoA (Newman & Chappell, 1999; Sapir-Mir *et al.*, 2008) και το μονοπάτι της 4-φωσφορικής-2-μεθυλερυθριτόλης

(MEP) που λειτουργεί στα πλαστίδια και χρησιμοποιεί πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη για τη βιοσύνθεση των IPP/ DMAPP (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999).

Το πρώτο μονοπάτι παράγει, μέσω διαδοχικών αντιδράσεων, το πρόδρομο μόριο διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) από το οποίο προκύπτουν σχεδόν όλα τα σесκίτερπενια, οι στερόλες και τα τριτερπενια ενώ το δεύτερο παράγει τις πρόδρομες ενώσεις: διφωσφορικό γερανύλιο (GPP) και διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο (GGPP) από τις οποίες προκύπτουν τα μονοτερπενια και τα διτερπενια και τετρατερπενια αντίστοιχα (Tholl, 2015, pp. 65).

Το IPP που προέρχεται από το μονοπάτι MVA μπορεί επίσης να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια για την βιοσύνθεση ουβικινόνης (Disch *et al.*, 1998), ενώ ακόμα έχει παρατηρηθεί μια περιορισμένη ανταλλαγή IPP μεταξύ των πλαστιδιακών και των κυτοσολικών μονοπατιών (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Bouvier *et al.*, 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Κυτταρική τοπολογία των δύο βασικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των τερπενίων σύμφωνα με την διαμερισματοποίηση των ενζύμων στο *Arabidopsis thaliana*. Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις του μονοπατιού MVA αναπαριστώνται με μπλε χρώμα ενώ τα ένζυμα του μονοπατιού MEP με πράσινο. Τα διακεκομμένα βέλη σημαίνουν πολλαπλά βήματα και τα ανοιχτά βέλη αντιπροσωπεύουν τη μεταφορά των μεταβολιτών μεταξύ των διαμερισμάτων των κυττάρων. Συντομογραφίες: CDP-ME: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol, CDP-MEP: CDP-ME 2-phosphate, DMAPP: dimethylallyl diphosphate,

DXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, FPP: farnesyl diphosphate, GGPP: geranylgeranyl diphosphate, GPP: geranyl diphosphate, HBMPP: 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate, HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA, IPP: isopentenyl diphosphate, MEcPP: 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate, MEP: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MVA: mevalonic acid, MVP: 5-phosphomevalonate, MVPP: 5-diphosphomevalonate (από Pulido *et al.*, 2012).

1.5 Παραγωγή τριτερπενίων

Τα τριτερπένια αποτελούν κύρια υποομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων (Xu *et al.*, 2004) και βιοσυντίθενται μέσω του μονοπατιού MVA (Chappell, 2002).

Το πρώτο βήμα διαφοροποίησης στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών είναι η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου που καταλύεται από τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) οι οποίες μετατρέπουν το οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες κυκλικές τριτερπενικές αλκοόλες με μέχρι έξι καρβοκυκλικούς δακτυλίους (Abe *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2006; ΕΙΚΟΝΑ 3).

Οι OSCs λειτουργούν σταθεροποιώντας ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων (Phillips *et al.*, 2006) και παράγουν στερόλες και τριτερπένια μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει (α) την δέσμευση και προ-αναδιοργάνωση του υποστρώματος (αναδίπλωση), (β) την έναρξη της αντίδρασης με πρωτονίωση του εποξειδίου, (γ) κυκλοποίηση και αναδιάταξη των καρβοκατιόντων που προκύπτουν και (δ) τερματισμό της αντίδρασης μέσω αποπρωτονίωσης ή πρόσληψης νερού σχηματίζοντας το τελικό προϊόν (Thimmaparra *et al.*, 2014).

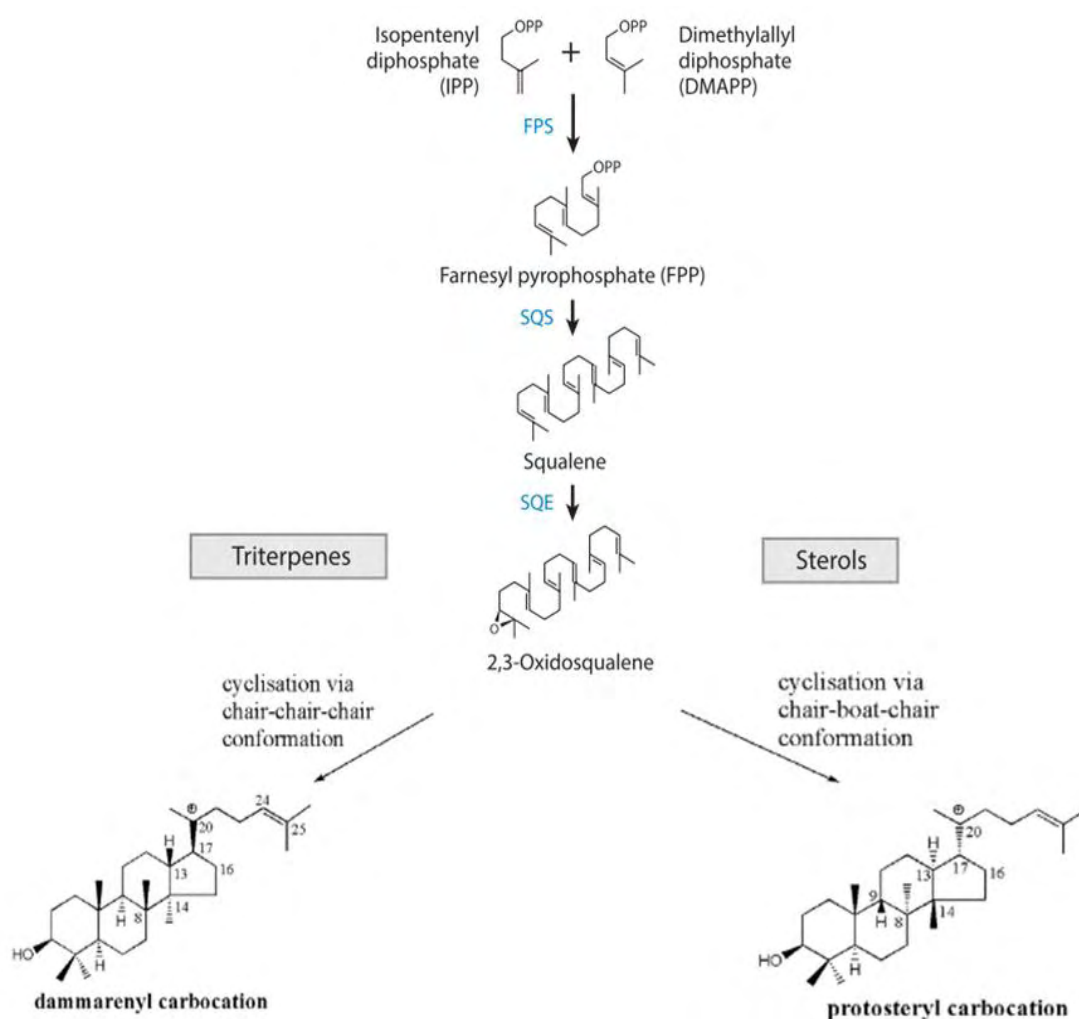
Αν και η παραλλαγές στην κυκλοποίηση του καρβοκατιόντος και τα στάδια αναδιάταξης συνεισφέρουν ουσιαστικά στην ποικιλομορφία των δομών, το αρχικό βήμα αναδίπλωσης του υποστρώματος είναι κρίσιμο, επειδή αυτό προδιαθέτει το υπόστρωμα να ακολουθήσει μία συγκεκριμένη οδό κυκλοποίησης (Thimmaparra *et al.*, 2014).

Για τον σχηματισμό του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, αρχικά παράγεται το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) μέσω της συνθάσης του διφωσφορικού φαρνεσυλίου (FPS) από την ένωση του IPP και του DMAPP. Δύο μόρια FPP ενώνονται από την συνθάση του σκουαλενίου (SQS) δίνοντας μια ένωση με 30 άτομα άνθρακα, που ονομάζεται σκουαλένιο (Holstein & Hohl, 2004), το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται από την εποξειδάση του σκουαλενίου σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο (Abe *et al.*, 1993; Haralampidis *et al.*, 2002).

Η διαδικασία της κυκλοποίησης του οξειδοσκουαλενίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, μέσω της «chair-chair-chair» (CCC) ή της «chair-boat-chair» (CBC) διαμόρφωσης. Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο σκελετών που προκύπτουν έγκειται στη στεreoχημεία, η οποία φαίνεται σαφέστερα από τις διαμορφώσεις των ατόμων άνθρακα 8 και 14. Μετά την κυκλοποίηση της διαμόρφωσης «chair-chair-chair» η μεθυλομάδα του άνθρακα 8 «δείχνει» προς τα πάνω και η μεθυλομάδα του άνθρακα 14 προς τα κάτω, ενώ στη διαμόρφωση «chair-boat-chair» εμφανίζεται η αντίθετη στεreoδιάταξη (Vincken *et al.*, 2007; ΕΙΚΟΝΑ 3).

Η επαγόμενη από πρωτόνια κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου οδηγεί στην παραγωγή του κατιόντος του νταμαρενυλίου (CCC διαμόρφωση) πρόδρομο των διαφόρων τριτερπενίων ή του κατιόντος του προτοστερυλίου (CBC διαμόρφωση) από το οποίο προκύπτουν οι στερόλες (Thimmapra *et al.*, 2004).

Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από τις OSCs είτε σε τετρακυκλικές στερόλες, μέσω ενζύμων όπως η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CS) ή σε πεντακυκλικά τριτερπενία, μέσω της δράσης ενζύμων όπως η συνθάση της β-αμυρίνης (β-AS) αντιπροσωπεύει ένα κρίσιμο σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (Phillips *et al.*, 2006) και μια από τις πολυπλοκότερες ενζυμικές αντιδράσεις που είναι γνωστές στον μεταβολισμό των τερπενίων (Wendt, 2005 ; Abe, 2007).



ΕΙΚΟΝΑ 3: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων και των στερολών στα φυτά. Οι στερόλες και τα τριτερπένια συντίθενται μέσω του μονοπατιού MVA έχοντας ως πρόδρομο μόριο το 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Συντομογραφίες: FPS: farnesyl pyrophosphate synthase, SQS: squalene synthase, SQE: squalene monooxygenase or epoxidase (από Thimmappa *et al.*, 2014; Pulido *et al.*, 2012).

1.6 Παραγωγή β-αμυρίνης και λουπεόλης από OSCs

Τα τριτερπένια που προέρχονται από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο περαιτέρω επεξεργάζονται με οξειδωτικές και άλλες τροποποιήσεις και με γλυκοζυλίωση και συσσωρεύονται ως δομικά πολύπλοκα τριτερπενικά γλυκοσίδια (γνωστά και ως τριτερπενοειδείς σαπωνίνες; Jenner *et al.*, 2005).

Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες αποτελούνται από υδρόφοβες τριτερπενοειδής αγλυκόνες που ονομάζονται σαπογενίνες και ένα ή περισσότερα υδρόφιλα τμήματα σακχάρου (Sawai & Saito, 2011). Το όνομα τους προκύπτει από τη λατινική λέξη

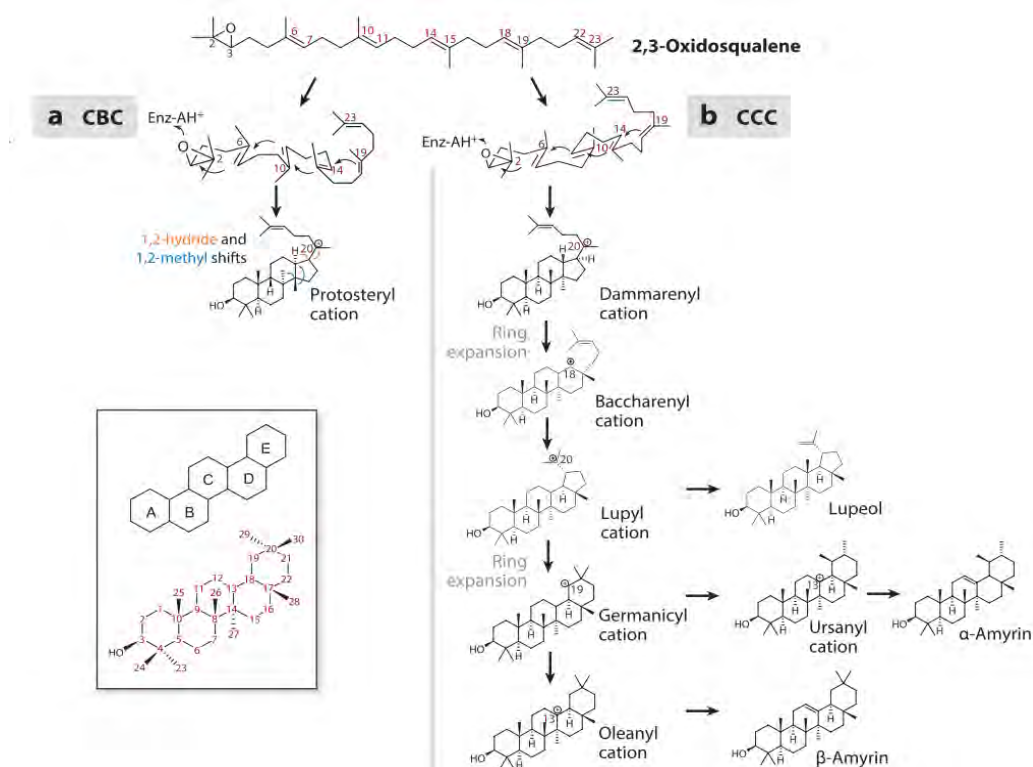
"sapo" που σημαίνει "σαπούνι", και αντικατοπτρίζει την ευρεία ικανότητα τους να σχηματίζουν σταθερούς αφρούς τύπου σαπουνιού σε υδατικά διαλύματα.

Ο βιολογικός ρόλος των σαπωνινών δεν είναι πλήρως κατανοητός, ωστόσο ορισμένες τριτερπενοειδείς σαπωνίνες πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε συστήματα άμυνας έναντι μικροβιακών παθογόνων ή εντόμων (Osbourne, 1996; Papadopoulou *et al.*, 1999; Agrell *et al.*, 2003)

Οι σαπωνίνες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον ανθρακικό τους σκελετό, όπως αυτός προκύπτει από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης τους σε 11 βασικές κατηγορίες, με τον πιο διαδεδομένο τύπο σκελετού στις περισσότερες τάξεις φυτών να είναι ο τύπος των ολεανινών (Vincen *et al.*, 2007).

Για τον σχηματισμό του βασικού σκελετού των ολεανινών απαιτούνται τουλάχιστον πέντε διακριτές αλλαγές στο μόριο του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (ΕΙΚΟΝΑ 4). Αρχικά, όπως ειπώθηκε προηγουμένως από την κυκλοποίηση της CCC διαμόρφωσης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προκύπτει το κατιόν του νταμαρενυλίου. Εναλλακτικές αναδιατάξεις αυτού του κατιόντος, συμπεριλαμβανομένης της επέκτασης του δακτυλίου και των μετατοπίσεων μεθυλίων και υδρογόνων που μετακινούν το κατιόν μέσω μίας σειράς ενδιάμεσων καρβοκατιόντων, δημιουργούν μια ποικιλία σκελετικών ενδιάμεσων κατά μήκος της διαδρομής (Abe, 2007; Abe *et al.*, 2004a, 2004b; Xu *et al.*, 2004).

Στις τριτερπένια ανήκουν η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη. Η συνθάση της λουπεόλης κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό του κατιόντος της λουπεόλης, προωθεί την επέκταση του δακτυλίου και αποσπά ένα πρωτόνιο για να σχηματιστεί η λουπεόλη. Από την άλλη η συνθάση της β-αμυρίνης παράγει επίσης το κατιόν της λουπεόλης και επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό την επέκταση του δακτυλίου και ορισμένες αναδιαμορφώσεις, πριν την αποπρωτονίωση προς σχηματισμό β-αμυρίνης (Phillips *et al.*, 2006; ΕΙΚΟΝΑ 4).



ΕΙΚΟΝΑ 4: Διάγραμμα της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλένιου μέσω των OSCs προς σχηματισμό της α- και β-αμυρίνης και της λουπεόλης. Συντομογραφίες: CBC: Chair-Boat-Chair διαμόρφωση, CCC:Chair-Chair-Chair διαμόρφωση (από Thimmappa *et al.*, 2014).

Στα τριτερπένια που εμφανίζονται στο *Lotus japonicus* περιλαμβάνεται τόσο η β-αμυρίνη όσο και η λουπεόλη (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003; Delis *et al.*, 2011).

Η μελέτη της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων στο *Lotus japonicus* περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στις OSCs. Οι OSCs από το *L. japonicus* ταυτοποιήθηκαν με κλωνοποίηση cDNA, απομονώθηκαν από γονιδιωματικές βιβλιοθήκες και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003). Ταυτοποιήθηκαν 8 γονίδια που κωδικοποιούν OSCs και βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2(CM0373) και το χρωμόσωμα 3(CM0292). Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων αυτών σε λειτουργικό επίπεδο έγινε στην ζύμη και έδειξε ότι η OSC1 κωδικοποιεί μία συνθάση της β-αμυρίνης ενώ η OSC3 μία συνθάση της λουπεόλης. Η έκφραση των *LjAMY1* (OSC1) και *LjAMY2* (OSC8) στη ζύμη έδειξε ότι το πρώτο γονίδιο κωδικοποιεί μία συνθάση της β-αμυρίνης ενώ το δεύτερο μία συνθάση τριτερπενοειδών μικτής δράσης που έχει την ικανότητα να παράγει β-αμυρίνη και λουπεόλη ως τα κύρια προϊόντα της (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003). Είναι γνωστό ότι η OSC1, η OSC8 και η OSC3 εκφράζονται επιλεκτικά στις ρίζες και στα φυμάτια του *L. japonicus* (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003; Sawai *et al.*, 2006; Delis *et al.*, 2011).

Η περαιτέρω διερεύνηση των OSCs, λόγω της κατάλυσης τους μια από τις πολυπλοκότερες ενζυμικές αντιδράσεις που είναι γνωστές στον μεταβολισμό των τερπενίων (Wendt, 2005 ; Abe, 2007), αλλά και της παραγωγής προϊόντων όπως η

β-αμυρίνη και η λουπεόλη με ευρεία γκάμα λειτουργιών, αποκτά μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πλήρη κατανόηση αυτών των μεταβολικών οδών, που θα μπορούσε να μας επιτρέψει την τροποποίηση και ρύθμιση της περιεκτικότητας των φυτικών οργανισμών σε μεταβολίτες της κατηγορίας των τριτερπενίων. Έτσι μπορεί να επηρεαστεί η συσσώρευση επιθυμητών ουσιών σε ορισμένα φυτά και να βελτιωθούν οι φαρμακευτικές και κοσμητικές τους χρήσεις. Εναλλακτικά, μπορεί η επίδραση στον μεταβολισμό να τροποποιήσει τα αγρονομικά χαρακτηριστικά παραγωγικών φυτών ενισχύοντας την ανθεκτικότητα σε προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς ή την αζωτοδεύσμευση ενεργοποιώντας το σχηματισμό ριζοβιακών σχέσεων που συμβάλουν σ' αυτήν (Confalonieri *et al.*, 2009).

1.7 Λειτουργίες β-αμυρίνης και λουπεόλης

Η λουπεόλη, η β-αμυρίνη και οι διάφοροι μεταβολίτες τους εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες των φυτών.

Η β-αμυρίνη αποτελεί πρόδρομο των σαπωνινών, οι οποίοι είναι τριτερπενικοί γλυκοζίτες όπως η αντιμυκητιακή σαπωνίνη αβεννασίνη που βρίσκεται στις ρίζες του φυτού *Avena* (Paradouroulou *et al.*, 1999; Haralampidis *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2004). Επιπρόσθετες δράσεις της έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένα φυτά όπως στο φυτό *Pisum sativum* όπου οι σαπωνίνες συμβάλλουν στον βαρυτροπισμό και στην παραγωγή κυτταρίνης (Rahman *et al.*, 2001).

Στη βρώμη, η αυξημένη περιεκτικότητα σε β-αμυρίνη στις ρίζες οδηγεί σε βραχύτερες ρίζες με ένα έντονο φαινότυπο hairy root (πυκνές και σγουρές ρίζες; Kemen *et al.*, 2014). Κατά την έρευνα των Kemen *et al.* (2014) η συσσώρευση υψηλών επιπέδων β-αμυρίνης προκαλεί μια αλλαγή στην τύχη των κυττάρων στην επιδερμίδα της ρίζας, με περισσότερα κύτταρα να ορίζονται ως τριχοβλάστες (κύτταρα που δημιουργούν διακλαδώσεις της ρίζας). Αυτό αποτελεί και την πρώτη περίπτωση όπου ένα απλό τριτερπένιο εμπλέκεται στην φυτική ανάπτυξη μέσω της αλλαγής της μοίρας των κυττάρων στη ρίζα. Επίσης, παρατηρήθηκε ένας σαφής δεσμός μεταξύ του μήκους της ρίζας και της ποσότητας της β-αμυρίνης που συσσωρεύεται στις ρίζες, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση αυξημένων επιπέδων β-αμυρίνης πυροδοτεί αλλαγές στον κυτταρικό προσδιορισμό και στο μήκος της ρίζας (Moses *et al.*, 2014).

Ακόμα, έχειδειχθεί ότι η β-αμυρίνη είναι δομικό συστατικό της μεμβράνης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης στα ψυχανθή και η σύνθεση της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της δημιουργίας ριζόβιων και μυκορριζικών συμβιωτικών σχέσεων (Baisted, 1971; Hernandez & Cooke, 1996; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003). Η ετερόλογη έκφραση της AsOX1 (συνθάση β-αμυρίνης του φυτού *Aster sedifolius*) στο *Medicago Truncatula* είχε σαν αποτέλεσμα

τη συσσώρευση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων, προερχόμενων από την β-αμυρίνη σαπογενινών, στα φύλλα, τις ρίζες και τα φυμάτια του φυτού, το οποίο εμφάνισε αύξηση του αριθμού των φυματίων του σε σχέση με τα φυτά ελέγχου (Confalonieri *et al.*, 2009).

Ακόμη, έχουν προταθεί και φαρμακολογικές χρήσεις της β-αμυρίνης, απομονωμένης από διάφορα φυτικά είδη, ως αναλγητικό (Otuki *et al.*, 2005), ως αντιβακτηριακή ουσία ευρείας δράσης (Samy & Gopalakrishnakone, 2008) και πιθανών ως αντικαρκινική ουσία (Dixon & Sumner, 2003).

Από την άλλη η έκφραση της συνθάσης της λουπεόλης συσχετίζεται με την φυματογένεση σε πολλά φυτά. Για παράδειγμα, η συνθάση της λουπεόλης στο φυτό *Glycyrrhiza glabra* εκφράζεται σε φυμάτια και καλλιεργημένα κύτταρα, στις ίδιες περιοχές όπου ανιχνεύεται το βιτουλινικό οξύ που είναι μεταβολίτη της λουπεόλης (Hayashi *et al.*, 2004). Ακόμα, φαίνεται πως εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση των πρώιμων διαδικασιών της φυματογένεσης στο φυτό *Lotus japonicus* (Delis *et al.*, 2011). Τέλος, η λουπεόλη έχει δειχθεί, ότι επιδεικνύει διάφορες φαρμακολογικές δραστηριότητες (Saleem, 2009) υπό *in vitro* και *in vivo* συνθήκες όπως αυτές που περιλαμβάνουν την ευεργετική δράση της κατά της φλεγμονής, του καρκίνου και των καρδιακών παθήσεων (Fernández *et al.*, 2001; Sudharsan *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

1.8 Το ψυχανθές *Lotus japonicus*

Τα ψυχανθή φυτά είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την ανθρωπότητα ως πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα αλλά και για τις χρήσεις τους στη βιομηχανία



ΕΙΚΟΝΑ 5: Το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* σε ώριμο στάδιο ανάπτυξης.

(Graham & Vance, 2003). Τα περισσότερα έχουν την ικανότητα συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Στο ριζικό τους σύστημα, αναπτύσσονται διάφορα είδη της οικογένειας *Rhizobiaceae*, που έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Η αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τη ρίζα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία χαρακτηριστικών διογκώσεων, τα φυμάτια, όπου πραγματοποιείται και η αζωτοδέσμευση (Long, 1989). Η οικονομική σημασία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ψυχανθών οδήγησε στην αναζήτηση ενός φυτού μοντέλου, το

οποίο να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις, διαφορετικές από το *Arabidopsis thaliana*.

Πολλά καλλιεργούμενα ψυχανθή φυτά όπως το μπιζέλι (*Pisum sativum*) και η σόγια (*Glycine max*), λόγω των πολύπλοκων γονιδιωμάτων τους ή, για άλλους λόγους, δεν υπόκεινται σε σύγχρονες μοριακές γενετικές μεθόδους. Οι ευνοϊκές βιολογικές και γενετικές ιδιότητές του (Handberg & Stougaard 1992; Jiang & Gresshoff 1993), όπως το μικρό, διπλοειδές γονιδίωμα που έχει, κάνουν το *Lotus japonicus* (ΕΙΚΟΝΑ 5) το πρότυπο φυτό επιλογής για κλασσική και μοριακή γενετική ανάλυση των ψυχανθών (Stougaard, 2017), με μεγάλο ενδιαφέρον να εστιάζεται στις διαδικασίες της φυματογένεσης και της αζωτοδεύσμησης (Udvardi *et al.*, 2005).

Το *L. japonicus* φυλογενετικά ανήκει στο φύλο *Loteae* στα *Papilionoideae*, την μεγαλύτερη υποοικογένεια της *Leguminosae* που αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών συμπεριλαμβάνοντας 18.000 είδη. Είναι ένα δημοφιλές, καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο-φυτό ψυχανθών (Handberg & Stougaard, 1992), που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και μικροβίων λόγω της ικανότητάς του να δημιουργεί μια σειρά διαφορετικών τύπων σχέσεων με μικροοργανισμούς κατά μήκος του φάσματος παθογένεσης-συμβίωσης.

1.9 Γονιδιακές συστοιχίες (Gene clusters)

Οι γονιδιακές συστοιχίες (gene clusters) αποτελούνται από πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του ίδιου βιοσυνθετικού μονοπατιού και γειτονεύουν στο χρωμόσωμα.

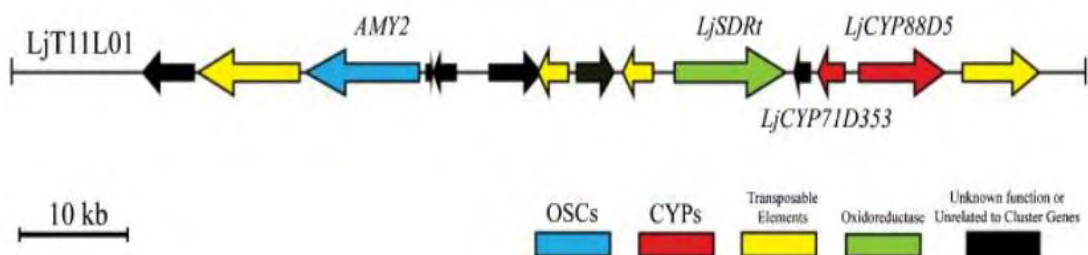
Υπάρχουν βασικά πλεονεκτήματα της ύπαρξης τους στους οργανισμούς όπως η συγκληρονόμηση τέτοιων ευνοϊκών συνδυασμών γονιδίων στον ίδιο γενετικό τόπο, η συρρύθμιση των γονιδίων της συστοιχίας, η οποία πραγματοποιείται καλύτερα και ευκολότερα ώστε τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού να παράγονται στο σωστό μέρος την κατάλληλη στιγμή, ενώ παράλληλα αποτρέπεται η συγκέντρωση επιβλαβών ενδιάμεσων του μεταβολισμού, που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη ή την επιβίωση του φυτού (Chu *et al.*, 2011).

Πολλές από αυτές έχουν βρεθεί σε αρκετά είδη φυτών. Όλες οι γνωστές γονιδιακές συστοιχίες που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα στα ανώτερα φυτά περιορίζονται σε λειτουργίες δευτερογενών μεταβολιτών με τις περισσότερες από αυτές να κωδικοποιούν βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενίων (Boycheva *et al.*, 2014).

Κοινό χαρακτηριστικό των γονιδιακών συστοιχιών των δευτερογενών μεταβολιτών είναι ότι διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή των σκελετικών δομών των εξειδικευμένων μεταβολιτών και επιπλέον γονίδια που κωδικοποιούν για τροποποιητικά ένζυμα του βασικού αυτού σκελετού, όπως οξειδοαναγωγάσες, μεθυλοτρανσφεράσες και γλυκοτρανσφεράσες (Osbourne, 2010).

Στο καλαμπόκι (*Zea mays*) βρέθηκε η πρώτη, χρονικά, γονιδιακή συστοιχία για την βιοσύνθεση του μορίου 2,4 διϋδροξυ-7-μέθοξυ-1,4 βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA) (Frey *et al.*, 1997).

Γονιδιακή συστοιχία παραγωγής τριτερπενίου έχει βρεθεί και στο φυτό *L. japonicus* (Krokida *et al.*, 2013; ΕΙΚΟΝΑ 6), η οποία περιέχει το γονίδιο της κυκλάσης του οξειδοσκουαλενίου *LjAMY2*, δύο γονίδια *P450s* (*LjCYP71D353* και *LjCYP88D5*) και ένα γονίδιο *SDRt* (κωδικοποιεί ένα ένζυμο με εκτεταμένη ομοιότητα στην short chain dehydrogenase/reductase-like πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο φυτό *A. thaliana*).



ΕΙΚΟΝΑ 6: Η γονιδιακή συστοιχία παραγωγής των τριτερπενίων β-αμυρίνης και λουπεόλης που βρέθηκε στο φυτό *L. japonicus* (Krokida *et al.*, 2013).

Το γονίδιο *LjAMY2* βιοσυνθέτει την τριτερπενική διϋδρολουπεόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε 20-υδροξυλουπεόλη και 20-υδροξυβετουλινικό οξύ από το γονίδιο *LjCYP71D353*. Η ακριβής λειτουργία του *LjCYP88D5* που υπάρχει επίσης στη συστοιχία δεν είναι γνωστή, ενώ το γονίδιο *SDRt* θεωρείται ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο (Krokida *et al.*, 2013). Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η (διϋδρο)λουπεόλη ρυθμίζει την φυματογένεση στα αρχικά στάδια στο *L. japonicus* (Delis *et al.*, 2011), εξηγώντας την αυξημένη έκφραση της συστοιχίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ριζών και των φυματίων.

1.10 Μετασχηματισμός με το *Agrobacterium rhizogenes* και “Hairy root” φαινότυπος

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο ευθύνεται για τη νεοπλαστική ασθένεια “Hairy root” στα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανάπτυξη του ριζικού ιστού με πολλές διακλαδιζόμενες, σγουρές ρίζες μικρότερου μήκους από το φυσιολογικό (White *et al.*, 1985; Chilton *et al.*, 1982).

Η παθογένειά του αγροβακτηρίου οφείλεται σε παράγοντες που κωδικοποιούνται από το πλασμίδιο Ri (Root inducing), μέσω των οποίων δημιουργούνται κορωνοτοί κάλλοι (Terfer, 1984). Για την ακρίβεια, το πλασμίδιο αυτό φέρει μια περιοχή που ονομάζεται T-DNA που μεταφέρεται και ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα, όπου εκφράζονται τα περιεχόμενα σ’ αυτό γονίδια και εκδηλώνεται η παθογένεια των βακτηρίων (Chilton *et al.*, 1982).

Στο T-DNA υπάρχουν γονίδια βιοσύνθεσης φυτοορμονών (αυξινών και κυτοκινών) που εκφράζονται στα μετασχηματισμένα κύτταρα και προκαλούν σύνθεση ορμονών επιφέροντας αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την εμφάνιση νεοπλαστικών δομών (White *et al.*, 1985). Πιο συγκεκριμένα, ο φαινότυπος “Hairy root” οφείλεται στα γονίδια *rol A*, *B*, *C*, *D* τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του T-DNA. Το γονίδιο *rolA* είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό αυτού του φαινότυπου, το γονίδιο *rolB* επάγει τη ριζογένεση και το σχηματισμό των κάλλων, το γονίδιο *rolC* προωθεί την ανάπτυξη της ρίζας ενώ το *rolD* καταστέλλει την ανάπτυξη του κάλλου (White *et al.*, 1985).

Επίσης μεταφέρονται γονίδια σύνθεσης οπινών που αποτελούν πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας για τα βακτήρια. Η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτό οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κυττάρων τα οποία παράγουν θρεπτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά από τα βακτήρια αυτά (Sinkar *et al.*, 1987).

Η διαδικασία της ενσωμάτωσης μεσολαβείται από δύο αλληλουχίες 25bp, τα συνοριακά άκρα LB (αριστερό όριο) και RB (δεξί όριο) που εντοπίζονται στα άκρα του T-DNA. Η μεταφορά και ενσωμάτωση εμφανίζει πολικότητα και ξεκινά από το δεξί συνοριακό (Wang *et al.*, 1984). Για την αποκοπή, μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA απαιτείται η δράση των γονιδίων *vir*, που κωδικοποιούνται από περιοχή του Ri πλασμιδίου εκτός του T-DNA. (Bevan, 1984). Η εισαγωγή φαίνεται να γίνεται τυχαία αλλά κυρίως σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές του φυτικού γονιδιώματος.

Λόγω της ικανότητας μεταφοράς του T-DNA έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μετασχηματισμού πολλών φυτικών οργανισμών μέσω του *A. rhizogenes* (Chilton *et al.*, 1982; David *et al.*, 1984, Diaz *et al.*, 1989). Χρησιμοποιούνται δυαδικά σύστημα

φορέων κατά τα οποία η κατασκευή T-DNA κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και εισάγεται σε βακτηριακό κλώνο που περιέχει δεύτερο πλασμίδιο με τα γονίδια *vir* για τη μεταφορά του T-DNA (Gustavo *et al.*, 1998). Η μέθοδος “Hairy root” επιτρέπει τη δημιουργία σύνθετων φυτών με μετασχηματισμένες ρίζες σε ένα μήνα, μέσω του *A. rhizogenes*. Τα φυτά που προκύπτουν μ’ αυτή τη μέθοδο δεν είναι διαγονιδιακά, αλλά αποτελούνται από υπέργειες δομές αγρίου τύπου και μετασχηματισμένες ρίζες. Σε περίπτωση που απαιτούνται πλήρως μετασχηματισμένα-διαγονιδιακά φυτά, μετασχηματισμένες ρίζες μπορούν να επιλεγθούν και να χρησιμοποιηθούν για αναγέννηση φυτών χωρίς δεύτερη μόλυνση με την επιθυμητή κατασκευή (Constantino *et al.*, 1984; Tepfer, 1984; Crane *et al.*, 2006).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των hairy roots είναι ότι συχνά παρουσιάζουν περίπου την ίδια ή και μεγαλύτερη βιοσυνθετική ικανότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε σύγκριση με τα μητρικά φυτά (Kim *et al.*, 2002a, 2002b). Έχει αποδειχθεί πως οι hairy roots καλλιέργειες είναι πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων και το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των μεταβολικών οδών. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποσαφηνιστούν τα ενδιάμεσα και τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών (Hu & Du, 2006).

1.11 Φυματογένεση

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, τα φυτά έχουν εφεύρει διάφορες λύσεις για το πρόβλημα της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στη γη. Μια από τις λύσεις ήταν η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Ένα τέτοιο είδος αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτού-μικροβίου είναι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση η οποία εμφανίζεται στα ψυχανθή τα οποία συμβιώνουν στις ρίζες τους με βακτήρια των γενών *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, και *Sinorhizobium* (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996).

Πρόκειται για μια πολύ ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού ξενιστή και του βακτηριακού στελέχους η οποία έχει μελετηθεί και αναλυθεί εκτεταμένα στο πέρασμα των ετών μέσω πάρα πολλών επιστημονικών ερευνών (Garg & Manchanda, 2007).

Κατά την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης σχηματίζεται ένα νέο φυτικό όργανο με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο

ονομάζεται φυμάτιο. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Έχουν χαρακτηριστεί δύο διαφορετικοί τύποι φυματίων, τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια (Hadri & Bisseling, 1998). Τα καθορισμένα φυμάτια στερούνται τη συνεχή δραστηριότητα του μεριστώματος και είναι σφαιρικά. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής και καθώς η ρίζα επιμηκύνεται, σχηματίζονται καινούρια. Στα μη καθορισμένα φυμάτια παρατηρείται συνεχής δραστηριότητα του μεριστώματος και οι συνεχείς κυτταροδιαίρεσεις συμβάλουν στη δημιουργία φυματίων κυλινδρικού σχήματος. Τα μη καθορισμένα φυμάτια, σε αντίθεση με τα καθορισμένα, διαθέτουν εκτεταμένο σύστημα ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Επιπλέον, τις περισσότερες φορές, αποθηκεύουν το άμυλο και στα μολυσμένα και στα μη μολυσμένα κύτταρα, σε αντίθεση με τα καθορισμένα φυμάτια, στα οποία το άμυλο δεν εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα (Gordon *et al.*, 1992).

Η συμβιωτική σχέση αποβαίνει αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο (Udvardi & Poole, 2013; Udvardi & Day, 1997; White *et al.*, 2007).

Οι συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τη μοριακή επικοινωνία μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του μικροσυμβιώτη στη ριζόσφαιρα (Oldroyd *et al.*, 2005). Για την προσαρμογή των ριζοβίων στο νέο τους ρόλο ως μικροσυμβιώτες απαιτείται η ενεργοποίηση ενός περιορισμένου συνόλου μεταβολικών μονοπατιών και η καταστολή κάποιων άλλων. Σε αυτή τη διαφοροποίηση έχουν μεγάλη σημασία οι φυσιολογικές και βιοχημικές συνθήκες που επιβάλλονται από το φυτό. Και το ίδιο το φυτό όμως υφίσταται κάποια διαφοροποίηση στο μεταβολισμό του κατά τη διαδικασία δημιουργίας των φυματίων (Kahn *et al.*, 1998).

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας του εδάφους και ανήκει στο γένος *Mesorhizobium* της οικογένειας *Phyllobacteriaceae*. Το *M. loti* μπορεί και υιοθετεί δύο διαφορετικούς τρόπους διαβίωσης. Αρχικά, μπορεί να αναπτυχθεί ελεύθερα στο έδαφος αλλά όταν δεν υπάρχει άφθονο διαθέσιμο άζωτο μπορεί και αποικίζει στις ρίζες του *Lotus japonicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων γίνεται η αζωτοδέσμευση. Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων λόγω αρκετών

πλεονεκτημάτων που εμφανίζει όπως το μικρό του μέγεθος, ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής του, η αυτογονιμότητα, το μικρό μέγεθος του γενώματος και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών (Handberg & Stougaard 1992; Udvardi *et al.*, 2005).

Παρά την ευρεία χρήση του φυτού αυτού για τη έρευνα της φυματογένεσης, και παρότι έχει βρεθεί ότι τριτερπένια όπως η β-αμυρίνη και η λουπεόλη συμμετέχουν σ' αυτή τη διαδικασία, δεν έχουν γίνει εκτενείς μελέτες προσδιορισμού του ρόλου των τριτερπενοϊδών αυτών. Αυτός είναι και ο λόγος πραγματοποίησης αυτής της πτυχιακής εργασίας, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η λειτουργία αυτών των ενώσεων. Έτσι, υπερεκφράζοντας το γονίδιο *LjAMY2*, που κωδικοποιεί μια συνθάση μικτής δράσης, που οδηγεί στον σχηματισμό β-αμυρίνης και ενός παραγώγου της λουπεόλης, γίνεται μια προσπάθεια εξακρίβωσης του τρόπου εμπλοκής αυτών των ενώσεων στην εγκαθίδρυση συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του φυτού *Lotus japonicus* και του ριζόβιου *Mesorhizobium loti*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απολύμανση σπόρων *Lotus japonicus*

Σπόροι *Lotus japonicus* (οικότυπος GifuB129) μεταφέρθηκαν σε tubes των 1,5ml. Έπειτα, καλύφθηκαν με θειικό οξύ (H_2SO_4) για 10 λεπτά επί συνεχή ήπια ανάδευση. Πραγματοποιήθηκαν 6 πλύσεις με κρύο δις απεσταγμένο νερό (ddH_2O). Στη συνέχεια, οι σπόροι καλύφθηκαν εκ νέου με διάλυμα που περιείχε 20% χλωρίνη, 0,1% Tween20 και αποστειρωμένο ddH_2O για 20 λεπτά επί συνεχή ανάδευση. Μετά, έγιναν 5-7 πλύσεις με αποστειρωμένο ddH_2O και στο τέλος, αφού προστέθηκε αρκετό ddH_2O ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια όλων των σπόρων, και αφού τα tubes καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο προκειμένου να δημιουργηθούν συνθήκες σκοταδιού, τοποθετήθηκαν στους 4°C για ολονύχτια επώαση.

2.2 Συνθήκες ανάπτυξης των σπόρων *Lotus japonicus*

Οι σπόροι *Lotus japonicus* μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απολύμανσης τους, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με dH_2O και 0,8% άγαρ. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm, στο οποίο έγιναν μερικές οπές με αποστειρωμένη λαβίδα προκειμένου τα φυτάρια να έχουν επαρκές οξυγόνο για να αναπτυχθούν, τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 4°C για ολονύχτια επώαση. Την επόμενη μέρα μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης, κατακόρυφα, με συνθήκες ανάπτυξης: θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φώς/σκοτάδι έως ότου εκβλαστήσουν. Έπειτα, από 2 μέρες και αφού οι σπόροι εκβλάστησαν, αφαιρέθηκε από τα τρυβλία το αλουμινόχαρτο και παρέμειναν σ' αυτά για άλλες 5 ημέρες.

Ακολούθησε μεταφορά των φυταρίων σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό μέσο $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS) και εκ νέου τοποθέτηση τους κατακόρυφα στον θάλαμο ανάπτυξης για 5 ημέρες, ώσπου να αναπτυχθούν επαρκώς για να γίνει η φύτευση τους.

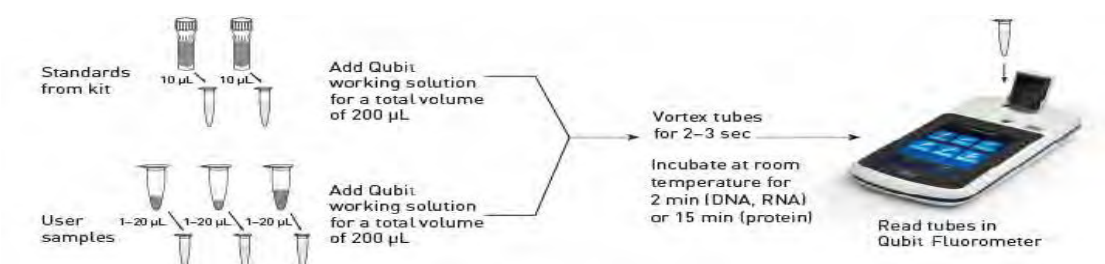
Έπειτα, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε γλάστρες που περιείχαν μίγμα άμμου:βερμικουλίτη αναλογίας 2:1 το οποίο προηγουμένως είχε αποστειρωθεί (121°C για 30') και είχε παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ημέρα προκειμένου να κρυώσει πλήρως. Επίσης, οι γλάστρες στο πάνω μέρος τους καλύφθηκαν με μεμβράνη, έως ότου τα φυτά προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες, και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης. Το πότισμα γινόταν κάθε δύο μέρες, με νερό και διάλυμα Hoaglands εναλλάξ.

2.3 Απομόνωση DNA με την χρήση διαλύματος CTAB από ιστούς ρίζας

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και τοποθέτηση των ιστών σε tubes των 1,5ml και έπειτα, έγινε λειοτριβήση των ιστών με τη βοήθεια αποστειρωμένων πλαστικών εμβόλων παρουσία υγρού αζώτου. Στη συνέχεια, και αφού προθερμάνθηκε το διάλυμα CTAB σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15', προστέθηκαν 100μl διαλύματος CTAB και 1μl μερκαπτοαιθανόλης ανά tube και έγινε επώαση στο υδατόλουτρο, στους 65°C για 15'. Προστέθηκαν 150μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, αναλογίας 24:1, ανά tube και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000rpm για 5'. Το υδατικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube και προστέθηκε σε αυτό ισοπροπανόλη(ποσότητα ισοπροπανόλης που προστέθηκε = 0,7* ποσότητα του δείγματος στο tube). Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια, επώαστηκε για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, το περιεχόμενο κάθε tube φυγοκεντρήθηκε στα 13.000rpm για 15'. Κατόπιν, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης 70% αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13.000rpm για 5' για να σταθεροποιηθεί το ίζημα, αφαίρεση του υπερκείμενου και επώαση στους 37°C για 20' μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη στο εσωτερικό τους. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20μl διαλύματος: αποστειρωμένου ddH₂O και RNάσης(Ct= 0,66 mg/ml) και τα tubes τοποθετήθηκαν στους -20 °C ωστόσο χρησιμοποιηθούν.

2.4 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση της μεθόδου Qubit® (Thermo Fisher Scientific)

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA και DNA των φυτών *L.japonicus* πραγματοποιήθηκε μέσω της συσκευής Qubit® (Thermo Fisher Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αναλογίες των συστατικών και η διαδικασία μέτρησης απεικονίζεται παρακάτω (ΕΙΚΟΝΑ 7).



ΕΙΚΟΝΑ 7: Η διαδικασία ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων με τη μέθοδο Qubit®.

2.5 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA καθώς οδηγεί σε επαναλαμβανόμενη αντιγραφή μιας επιλεγμένης περιοχής ενός μορίου DNA. Η τεχνική της PCR βασίζεται στην ικανότητα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA, διαδοχικά και ελεγχόμενα, να αποδιατάσσεται και να επανασυντίθεται βάσει της συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων.

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.
- Ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων που υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλυσίδες και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής.
- Δίκλωνο μόριο DNA που επιθυμείται η ενίσχυσή του.
- Ιόντα Mg^{+2} που είναι απαραίτητα για την δράση του ενζύμου, συνοδευόμενα από το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια(dNTPs).

Μια τυπική αντίδραση PCR ξεκινά με την θέρμανση του μείγματος με στόχο τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν ενωμένα τα δύο πολυνουκλεοτίδια της διπλής έλικας οπότε το DNA-στόχος αποδιατάσσεται σε μονόκλωνα μόρια. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα τη μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA-στόχου όπως επίσης και πρόσδεση των εκκινήτων στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται προκειμένου η πολυμεράση να δράσει, για να επιτευχθεί η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 35 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Στο τέλος των 20-35 κύκλων, πραγματοποιείται μια τελευταία επέκταση ώστε δοθεί ο χρόνος στην Taq πολυμεράση να συμπληρώσει την επέκταση ημιτελών PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια και προγράμματα θερμοκυκλοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR.

- Για την ενίσχυση του γονιδίου *AMY2* από τον φορέα *pYES2:AMY2* χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

Αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια PCR	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα(V _T =50 µl)
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	1x	25 µl
Εμπρόσθιος εκκινητής(AMY2-F-attB1)	0,5 µM	2,5 µl
Οπίσθιος εκκινητής(AMY2-R-attB2)	0,5 µM	2,5 µl
DNA-στόχος	100pg	0,71 µl
ddH ₂ O		19,29 µl

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου AMY2.

- Το Q5 High-Fidelity 2X Master Mix περιλαμβάνει την Q5 High-Fidelity DNA πολυμεράση, τα dNTPS, ιόντα Mg⁺² και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση της πολυμεράσης.
- Η Q5 High-Fidelity DNA πολυμεράση έχει τη δυνατότητα ενίσχυσης με πολύ υψηλή πιστότητα(πάνω από 100 φορές μεγαλύτερη από την πιστότητα της KapaTaq πολυμεράσης) με αποτέλεσμα να έχει εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά σφάλματος καθιστώντας τη κατάλληλη για όλες τις εφαρμογές PCR που απαιτούν μεγαλύτερη ακρίβεια, π.χ. κλωνοποίηση ή για την ενίσχυση δύσκολων ή μεγάλων στόχων.

Συνθήκες ενίσχυσης:

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	98°C	30sec	Πριν τον 1 ^ο κύκλο
Αποδιάταξη DNA-στόχου	98°C	10sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	64°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	2min	Μετά τον τελευταίο κύκλο
Συντήρηση	4°C	∞	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *LjAMY2*.

Εκκινητές:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
Εμπρόσθιος εκκινητής (AMY2-F-attB1)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGGAAGCTGAAGGTA GCAG
Οπίσθιος εκκινητής (AMY2-R-attB2)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAACTGCAATGGATGGTA ATGG

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου AMY2.

- ii. Για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων φυτών χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

Αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια PCR	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα (V _T =20 μl)
ΚαραΤαq πολυμεράση	0,4 U	0,08 μl
10x buffer with Mg ²⁺	1x	2 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (Hyg-RTF)	0,2 μM	0,4 μl
Οπίσθιος εκκινητής (Hyg-RTR)	0,2 μM	0,4 μl
Μίγμα dNTPs	200 μM	0,4 μl
DNA-στόχος	< 1,000 ng	3 μl
ddH ₂ O		13,72 μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων φυτών.

Συνθήκες ενίσχυσης:

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	Πριν τον 1 ^ο κύκλο
Αποδιάταξη DNA-στόχου	95°C	30sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	55,6°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	40sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	Μετά τον τελευταίο κύκλο
Συντήρηση	4°C	∞	

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των μετασχηματισμένων φυτών.

Εκκινητές:

Για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων φυτών χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο επιλογής στην υδρομυκίνη που βρίσκεται στο εσωτερικό του φορέα pUB-GW-Hyg και περιέχεται στο T-DNA ένθεμα.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
Εμπρόσθιος εκκινητής (Hyg-RTF)	GACCAATGCGGAGCATATACG
Οπίσθιος εκκινητής (Hyg-RTR)	CAGCTTCGATGTAGGAGGGC

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Εκκινητές για ενίσχυση του γονιδίου της υδρομυκίνης.

- iii. Για τον έλεγχο ύπαρξης DNA έπειτα από αντίδραση DNAσης σε δείγματα RNA μετασχηματισμένων φυτών *L.japonicus* μολυσμένων με *M.loti*.

Αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια PCR	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα($V_T=20 \mu\text{l}$)
KapaTaq πολυμεράση	0,4 U	0,08 μl
10x buffer with Mg^{2+}	1x	2 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής(Hyg-RTF)	0,2 μM	0,4 μl
Οπίσθιος εκκινητής (Hyg-RTR)	0,2 μM	0,4 μl
Μίγμα dNTPs	200 μM	0,4 μl
δείγμα μετά από αντίδραση DNAσης	90 ng	1 μl
ddH ₂ O		15,72 μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης DNA.

Συνθήκες ενίσχυσης:

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	Πριν τον 1 ^ο κύκλο
Αποδιάταξη DNA-στόχου	95°C	30sec	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	56 °C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	40sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	Μετά τον τελευταίο κύκλο
Συντήρηση	4°C	∞	

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης DNA.

Εκκινητές:

Για τον έλεγχο της ύπαρξης DNA στα δείγματα έπειτα από αντίδραση DNAσης χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο της ουβικουτίνης του φυτού *L.japonicus*.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
Εμπρόσθιος εκκινητής (UbiF)	TTCCACCATCCTGAAGGTTA
Οπίσθιος εκκινητής (UbiR)	CTTGAGCTTGTGGCCAGTAT

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου της ουβικουτίνης.

2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Από υγρή προ-καλλιέργεια που είχε ήδη αναπτυχθεί, μεταφέρθηκαν 1,4ml σε tube του 1,5ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση 10.000g για 30". Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και διατηρήθηκε μόνο το ίζημα. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν και τα 5ml της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300μl διαλύματος P1(50mM Tris, 10mM EDTA, pH=8 μέσω HCl) και 3μl RNάσης ($C_t=3\text{mg/ml}$) στο tube και έγινε ανάδευση με συσκευή vortex ωστόσο το ίζημα διαλυτοποιήθηκε πλήρως. Προστέθηκαν 300μl διαλύματος P2(200mM NaOH, 1% SDS) και έγινε ήπια ανάδευση κάθε 30" για 2' ώσπου το μίγμα στο tube κατέστη διαυγές, οπότε και προστέθηκαν 300μl διαλύματος P3(3M Οξικό κάλιο, pH =5,5 μέσω οξικού οξέος) και το δείγμα αναδεύτηκε ήπια. Έπειτα, ακολούθησε επώαση στον πάγο για 10' και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στα 10.000g για 10'. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα tubes και έγινε επανάληψη της φυγοκέντρωσης στα 10.000g για 5' και εκ νέου μεταφορά σε νέα tubes άλλες 2 φορές. Ύστερα, αφού προστέθηκαν 600μl ισοπροπανόλη και ακολούθησε ήπια ανάδευση, το περιεχόμενο των tubes φυγοκεντρήθηκε στα 10.000g για 15'. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και διατηρήθηκε μόνο το ίζημα. Ακολούθως, έγινε προσθήκη 500μl διαλύματος 70% αιθανόλης, ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 10.000g για 10'. Τέλος, το διατηρούμενο ίζημα επώαστηκε για 20 λεπτά στη συσκευή heatblock στους 37°C και επαναδιαλύθηκε σε 20μl αποστειρωμένου ddH₂O.

2.7 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey Nagel (REF 740609.50).

Το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε σε σχέση με της οδηγίες του κατασκευαστή και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Αρχικά, αποκόπτεται η υπό μελέτη ζώνη DNA από την πηκτική αγαρόζη, μέσω αποστειρωμένου νυστεριού, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αγαρόζης κατά το δυνατόν περισσότερο και το κομμάτι του gel με το επιθυμητό τμήμα του DNA τοποθετήθηκε μέσα σε ένα tube. Έπειτα, αφού ζυγίστηκε το tube, προστέθηκαν 200μl διαλύματος NT1 για κάθε 100mg gel αγαρόζης περιεκτικότητας <2%. Ακολούθησε, επώαση για 10' στους 50°C, ενώ κάθε 2-3' γινότανε ανάδευση του tube σε συσκευή vortex ώστε το κομμάτι του gel να λιώσει πλήρως. Στη συνέχεια, σε tube των 2ml, στο οποίο τοποθετήθηκε κατάλληλη στήλη για την εξαγωγή του DNA, φορτώθηκαν 700μl του δείγματος και έγινε φυγοκέντρηση στα 11.000g για

30". Το διάλυμα που εξήλθε από τη στήλη απορρίφθηκε. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε έως ότου διήλθε από τη στήλη όλη η ποσότητα του δείγματος. Προστέθηκαν στη στήλη 700μl διαλύματος NT3, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30" και το εξερχόμενο από τη στήλη διάλυμα απορρίφθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα 1 φορά. Επιπρόσθετα, το tube με τη στήλη, φυγοκεντρήθηκε στα 11.000g για 5', το εξερχόμενο από τη στήλη διάλυμα απορρίφθηκε και εν συνεχεία επωάστηκε στους 70°C για 4'. Τέλος, αφού προστέθηκαν 12μl αποστειρωμένου ddH₂O(προθερμασμένου στους 70°C), έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10' και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 5'. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμα μία φορά.

2.8 Διαγνωστικές πέψεις πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη των πλασμιδιακών DNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο που προτείνεται από τη NEB(<https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>). Τα ένζυμα περιορισμού και τα πλασμιδιακά DNA που χρησιμοποιήθηκαν στις διαγνωστικές πέψεις παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

- Για την πέψη του πλασμιδίου pDONR207 και του πλασμιδίου με ενσωματωμένο το γονίδιο *AMY2*, pDONR207:AMY2 :

Αντιδραστήρια	pDONR207	Αντιδραστήρια	pDONR207:AMY2
DNA	0,6 μg	DNA	0,6 μg
Cutsmart buffer 10x	3μl	Cutsmart buffer 10x	3μl
EcoRI-HF	0,6μl	NdeI	0,6μl
EcoRV-HF	0,6μl	-	-
ddH ₂ O	μέχρι V _T =30μl	ddH ₂ O	μέχρι V _T =30μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Αντιδραστήρια και ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των πλασμιδίων pDONR207 και pDONR207:AMY2.

- Για την πέψη του πλασμιδίου pUB-GW-Hyg και του πλασμιδίου με ενσωματωμένο το γονίδιο *AMY2*, pUB-GW-Hyg:AMY2 :

Αντιδραστήρια	pUB-GW-Hyg	Αντιδραστήρια	pUB-GW-Hyg:AMY2	pUB-GW-Hyg:AMY2
DNA	0,6 μg	DNA	0,6 μg	0,6 μg
Cutsmart buffer 10x	3μl	Cutsmart buffer 10x	3μl	3μl
NdeI	0,6μl	KpnI-HF	0,6μl	-
ddH ₂ O	μέχρι V _T =30μl	EcoRV-HF	0,6μl	-
		PspXI	-	0,6μl
		XbaI	-	0,6μl
		ddH ₂ O	μέχρι V _T =30μl	μέχρι V _T =30μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Αντιδραστήρια και ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των πλασμιδίων pUB-GW-Hyg και pUB-GW-Hyg:AMY2.

Αφού τοποθετήθηκαν όλα τα αντιδραστήρια και το DNA στα tubes, πραγματοποιήθηκε ανάδευση και επώαση αυτών σε επωαστήρα, στους 37°C για 2 ώρες.

2.9 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334 και άμεσος μετασχηματισμός αυτών με το φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2

- Πρωτόκολλο δημιουργίας δεκτικών κυττάρων του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334.

Αρχικά, προετοιμάστηκε προ-καλλιέργεια του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334 σε 5ml θρεπτικού μέσου LB, παρουσία των αντιβιοτικών: ριφαμπικίνη(Ct =50μg/ml) και σπεκτινομυκίνη(Ct =100μg/ml). Η προ-καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 28°C υπό ήπια ανάδευση(180rpm) για 2 μέρες. Όταν παρατηρήθηκε ανάπτυξη της προ-καλλιέργειας, έγινε προσθήκη 2ml από αυτήν σε 50ml θρεπτικού μέσου LB που βρισκόταν σε φλάσκα των 250ml και επώαση στους 28°C, με γρήγορη ανάδευση(180rpm) έως ότου η καλλιέργεια είχε OD₆₀₀=0,624(επιθυμητό OD₆₀₀=0,5-1). Αφού, η καλλιέργεια απέκτησε την επιθυμητή οπτική πυκνότητα, τοποθετήθηκε στον πάγο μέχρι να παγώσει. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 3,000g στους 4°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1ml CaCl₂ (C=20mM). Τέλος, μοιράστηκαν 0,1ml από το διάλυμα των κυττάρων σε tubes των 1,5ml και τοποθετήθηκαν στους -80°C.

- Άμεσος μετασχηματισμός *A. rhizogenes* μέσω της μεθόδου Freeze-Thaw.

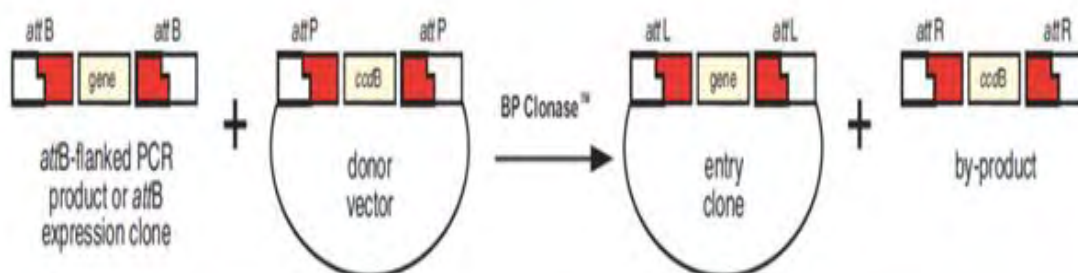
Σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους *A. rhizogenes* LBA 1334 προστέθηκε 1μg του πλασμιδιακού DNA και τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για να παγώσουν. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε υδατόλουτρο στους 37°C για 5 λεπτά μέχρι τα κύτταρα να λιώσουν. Έπειτα, προστέθηκε 1ml θρεπτικού μέσου LB στα κύτταρα και έγινε επώαση στους 28°C για 2 ώρες υπό ήπια ανάδευση(150rpm). Η περίοδος αυτή επέτρεψε στα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 30'' στα 11000g, αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων με 0,1ml θρεπτικού μέσου LB. Τέλος, έγινε επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB και άγαρ, παρουσία των αντιβιοτικών: ριφαμπικίνη(Ct =50μg/ml), σπεκτινομυκίνη(Ct =100μg/ml) και καναμυκίνη(Ct =100μg/ml) και επώαστηκαν στους 28°C για 2μέρες μέχρι την ανάπτυξη αποικιών. Μετά την ανάπτυξη των αποικιών δημιουργήθηκαν glycerol stocks με αναλογία γλυκερόλης/υγρής καλλιέργειας 4/6 και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.10 Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *AMY2* μέσω του συστήματος Gateway cloning® (Thermo Fisher Scientific)

Η κλωνοποίηση τύπου Gateway βασίζεται στον ανασυνδυασμό μεταξύ ειδικών θέσεων του βακτηριοφάγου λάμδα (λ) για τη μεταφορά αλληλουχιών μεταξύ πλασμιδίων που φέρουν εκατέρωθεν συμβατές θέσεις ανασυνδυασμού, *att* [recombination attachment (*att*) sites].

▪ Κατασκευή entry clone μέσω της αντίδρασης της BP κλωνάσης.

Μέσω της αντίδρασης της BP κλωνάσης(ΕΙΚΟΝΑ 8) μεταφέρθηκε το προϊόν της PCR με τα *attB* άκρα στον πλασμιδιακό φορέα δημιουργώντας έναν entry clone. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* με *attB* άκρα εκατέρωθεν της, μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pDONR207



ΕΙΚΟΝΑ 8: Αντίδραση BP-κλωνάσης: Διευκολύνει τον ανασυνδυασμό μεταξύ αλληλουχιών που πλαισιώνονται από τις περιοχές *attB* με φορείς που χαρακτηρίζονται από ειδική αλληλουχία(*ccdB*), την οποία και αναγνωρίζει η κλωνάση, που πλαισιώνεται από τις αλληλουχίες *attP*. Τελικά προκύπτει φορέας με την επιθυμητή αλληλουχία(πλαισιωμένη από τις αλληλουχίες *attL*) και ένα επιπλέον γραμμικό προϊόν που περιλαμβάνει την κασέτα *ccdB* ενδιάμεσα από τις αλληλουχίες *attR*

Πραγματοποιήθηκαν 5 αντιδράσεις BP-κλωνάσης. Στην πρώτη χρησιμοποιήθηκε αναλογία γονιδίου:πλασμιδιακού φορέα, 1:1, στη δεύτερη 2:1, ενώ στην τρίτη 3:1. Στην τέταρτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* δίχως *attB* άκρα εκατέρωθεν, ως negative control. Στην πέμπτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως positive control το pEXP7-tet που είναι ένα γραμμικό τμήμα δίκλωνου DNA μεγέθους 1.4 kb που έχει *attB* άκρα εκατέρωθεν του γονιδίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

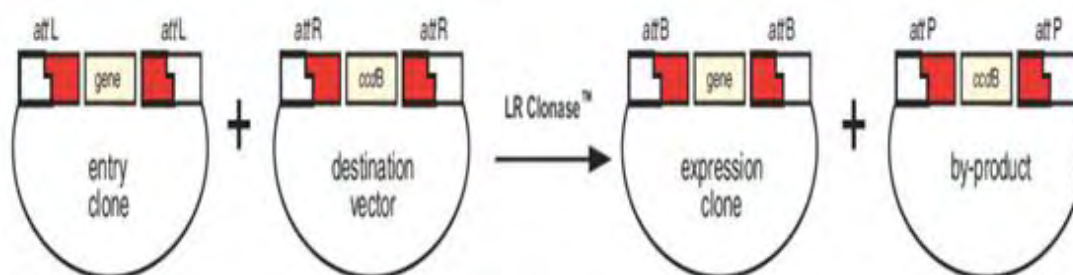
	αναλογία γονιδίου:πλασμιδιακού φορέα				
	1:1	2:1	3:1	1:1 αρνητικός μάρτυρας	θετικός μάρτυρας
κωδ. αλληλουχία <i>AMY2</i> με <i>attB</i> άκρα	40fmole	80fmole	120fmole	-	-
κωδ. αλληλουχία <i>AMY2</i> δίχως <i>attB</i> άκρα	-	-	-	40fmole	-
pEXP7-tet	-	-	-	-	100ng
pDONR207	40fmole	40fmole	40fmole	40fmole	40fmole
BP clonase II mix	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl
ddH ₂ O	έως V _{τελ} =10μl	έως V _{τελ} =10μl	έως V _{τελ} =10μl	έως V _{τελ} =10μl	έως V _{τελ} =7μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Αντιδραστήρια και ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για κατασκευή entry clone(pDONR207:AMY2) μέσω της αντίδρασης της BP κλωνάσης.

Αφού, έγινε επώαση των tubes στους 25°C για 1ώρα, προστέθηκε 1μl πρωτεϊνάσης K σε κάθε ένα από αυτά και ακολούθησε μια τελική επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.

▪ Κατασκευή expression clone μέσω της αντίδρασης της LR κλωνάσης.

Μέσω της αντίδρασης της LR κλωνάσης(ΕΙΚΟΝΑ 9) πραγματοποιείται με ανασυνδυασμό, μεταφορά της επιθυμητής αλληλουχίας που πλαισιώνεται από θέσεις ανασυνδυασμού(*attL1* και *attL2*) ώστε να δημιουργηθεί πλασμίδιο(expression clone) που περιέχει αυτήν την αλληλουχία πλαισιωμένη από τις *attB* περιοχές. Η αντίδραση καταλύεται από την LR κλωνάση. Σ' αυτό το πείραμα μεταφέρθηκε η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* από τον πλασμιδιακό φορέα pDONR207 στον φορέα pUB-GW-Hyg, που αποτελεί και τον τελικό φορέα(destination vector) υπερέκφρασης.



ΕΙΚΟΝΑ 9: Αντίδραση LR-κλωνάσης: Διευκολύνει τον ανασυνδυασμό μεταξύ αλληλουχιών που πλαισιώνονται από τις περιοχές *attL*(entry clone) προς δημιουργία πλασμιδίου(expression clone) που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία πλαισιωμένη από τις *attB* περιοχές.

Πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις LR-κλωνάσης με $V_{\text{τελ}}=5\mu\text{l}$. Στην πρώτη χρησιμοποιήθηκε αναλογία pDONR207:AMY2/pUB-GW-Hyg, 2/1 ενώ στη δεύτερη 3/1. Στην τρίτη αντίδραση(θετικό control) χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pENTR:GUS που εμπεριέχει το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης(GUS) της *Arabidopsis thaliana*, που πλαισιώνεται από περιοχές *attL*. Τέλος, στην τέταρτη αντίδραση (αρνητικό control) χρησιμοποιήθηκε αντί για την κατασκευή pDONR207:AMY2, η κατασκευή pYES:AMY2 στην οποία ουσιαστικά υπάρχει η κωδική αλληλουχία του γονιδίου AMY2 στον πλασμιδιακό φορέα pYES χωρίς ωστόσο, να πλαισιώνεται από περιοχές *attL* που είναι απαραίτητες για να γίνει ο ανασυνδυασμός.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	αναλογία entry clone/pUB-GW-Hyg			αναλογία pYES:AMY2/ pUB-GW-Hyg
	2:1	3:1	2:1 θετικός μάρτυρας	2:1 αρνητικός μάρτυρας
pDONR207:AMY2	20fmole	30fmole	-	-
pYES:AMY2	-	-	-	20fmole
pENTR:GUS	-	-	21fmole	-
pUB-GW-Hyg	10fmole	10fmole	10fmole	10fmole
LR clonase II mix	1μl	1μl	1μl	1μl
ddH ₂ O	έως $V_{\text{τελ}}=5\mu\text{l}$	έως $V_{\text{τελ}}=5\mu\text{l}$	έως $V_{\text{τελ}}=5\mu\text{l}$	έως $V_{\text{τελ}}=5\mu\text{l}$

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Αντιδραστήρια και ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για κατασκευή expression clone(pUB-GW-Hyg:AMY2 μέσω της αντίδρασης της LR κλωνάσης.

Αφού, έγινε επώαση των tubes στους 25°C για 1ώρα, προστέθηκαν 0,5μl πρωτεϊνάσης K σε κάθε ένα από αυτά και ακολούθησε μια τελική επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.

2.11 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

Ως δεκτικά κύτταρα *E.coli* για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα DH5a ultra competent cells (Sambrook J & Russell DW, 2006). Αρχικά, tubes με 100μl διαλύματος δεκτικών κυττάρων τοποθετήθηκαν ,από τους -80°C όπου βρίσκονταν, σε πάγο για 10 λεπτά για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 1μl του διαλύματος της αντίδρασης της LR/BP-κλωνάσης σε κάθε tube, ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 50 λεπτά. Ακολούθησε θερμικό σοκ σε συσκευή heatblock στους 42°C για 65 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Αφού έγινε προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB(προθερμασμένου στους 37°C) σε κάθε tube, αυτά επώαστηκαν για 50 λεπτά στους 37°C υπό γρήγορη ανάδευση(210rpm). Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 10000g,

αφαίρεση 800ml από το υπερκείμενο, διαλυτοποίηση των κατακρυμνισμένων κυττάρων με το υπόλοιπο υπερκείμενο και επίστρωση των καλλιεργειών σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB και άγαρ, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών: γενταμικίνη($C_{\text{τελ}}=10\mu\text{g/ml}$) για την αντίδραση της BP-κλωνάσης και καναμικίνη($C_{\text{τελ}}=50\mu\text{g/ml}$) για την αντίδραση της LR-κλωνάσης. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση(12-14 ώρες) στους 37 °C με γρήγορη ανάδευση(210rpm).

2.12 Hairy-roots μετασχηματισμός του φυτού *Lotus japonicus* διαμεσολαβούμενος από την παρουσία *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334

Ημέρα 1^η:

Απολύμανση 602 σπόρων *Lotus japonicus* (Ενότητα 2.1), επικάλυψη με αλουμινόχαρτο και τοποθέτηση τους στους 4°C για ολονύκτια επώαση.

Ημέρα 2^η:

Μεταφορά των σπόρων σε τρυβλία που περιείχαν dH₂O και άγαρ (0,8% w/v), τα οποία αφού καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, τοποθετήθηκαν στους 4°C για ολονύκτια επώαση.

Ημέρα 3^η:

Μεταφορά των τυλιγμένων με αλουμινόχαρτο τρυβλίων στον θάλαμο ανάπτυξης, κατακόρυφα, με συνθήκες ανάπτυξης: θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φώς/σκοτάδι έως ότου εκβλαστήσουν.

Ημέρα 5^η:

Αφαίρεση του αλουμινόχαρτου από τα τρυβλία και παραμονή αυτών στον θάλαμο ανάπτυξης σε κατακόρυφη θέση. Από τους 602 σπόρους *Lotus japonicus* που χρησιμοποιήθηκαν, εκβλάστησαν οι 320. Το ποσοστό βλαστικότητας ήταν 53,15%.

Ημέρα 6^η:

Δημιουργία δεκτικών κυττάρων του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334 (Ενότητα 2.9)

Ημέρα 7^η:

Άμεσος μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων που δημιουργήθηκαν με το φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2 και με τον φορέα pUB-GW-Hyg(αποτελεί το control) (Ενότητα 2.9).

Ημέρα 9^η:

Προετοιμάστηκαν, μια προ-καλλιέργεια *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2 και μια προ-καλλιέργεια *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα pUB-GW-Hyg(control) σε 5ml θρεπτικού μέσου LB παρουσία των αντιβιοτικών: ριφαμπικίνη(Ct =50μg/ml), σπεκτινομυκίνη(Ct =100μg/ml) και καναμυκίνη(Ct =100μg/ml). Οι προ-καλλιέργειες επωάστηκαν στους 28°C υπό ήπια ανάδευση(150rpm) ολονυκτίως.

Ημέρα 10^η:

Έγιναν στερεές καλλιέργειες *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2 και *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα pUB-GW-Hyg. Σε κάθε πιάτο έγινε επιστροφή 500μl από την υγρή καλλιέργεια. Συνολικά δημιουργήθηκαν 20 στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο LB, άγαρ και παρουσία των αντιβιοτικών: ριφαμπικίνη(Ct =50μg/ml), σπεκτινομυκίνη(Ct =100μg/ml) και καναμυκίνη(Ct =100μg/ml). Έγιναν 10 καλλιέργειες για κάθε φορέα, δεδομένου ότι μία καλλιέργεια θα χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση 15 φυτών. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 28 °C για 2 ημέρες.

Ημέρα 12^η:

Μόλυνση των φυτών *Lotus japonicus* αγρίου τύπου με *A.rhizogenes* LBA1334. Από τα 320 φυτά, που εκβλάστησαν από σπόρους *Lotus japonicus*, χρησιμοποιήθηκαν τα 300 που ήταν καλά αναπτυγμένα. 122 φυτά μολύνθηκαν με *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα υπερέκφρασης και 148 φυτά με *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα control. Επίσης, 30 φυτά διατηρήθηκαν δίχως να μολυνθούν.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία της μόλυνσης έγινε ως εξής:

Όλοι οι χειρισμοί έλαβαν χώρο σε θάλαμο νηματικής ροής. Αρχικά, έγινε προσθήκη 2 ml αποστειρωμένου ddH₂O σε μία στερεή καλλιέργεια αγροβακτηρίου και αυτή ξύθηκε με ένα tip πιπέτας ώστε να διαλυτοποιηθούν οι αποικίες. Έπειτα, 15 φυτά μεταφέρθηκαν από τα τρυβλία στα οποία αναπτύχθηκαν, σε στρόγγυλα τρυβλία Petri που προηγουμένως τους είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί νοτισμένο με 1ml καλλιέργειας *A.rhizogenes* μετασχηματισμένο με τον κατάλληλο φορέα για να αποφευχθεί η αποξήρανση της ρίζας. Στο στάδιο αυτό, με τη χρήση νυστεριού, κόπηκε η ρίζα των φυτών στο

σημείο του υποκοτυλίου. Αφότου, απομακρύνθηκαν τα άκρα των ριζών, τα διατηρημένα άκρα των φυτών επικαλύφθηκαν με το υπόλοιπο 1ml από τις αποικίες και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας τα κομμένα άκρα πιέστηκαν ώστε να τραυματιστούν, για να διευκολυνθεί η είσοδος του αγροβακτηρίου. Στη συνέχεια, τα επιμολυσμένα φυτά τοποθετήθηκαν ανά 8 σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό μέσο ½ MS, MES, 1% σουκρόζη, 1% άγαρ και με pH=5,6 ρυθμισμένο μέσω KOH 1M. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να επιμολυνθούν όλα τα φυτά. Στη συνέχεια, τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm στο οποίο έγιναν μερικά ανοίγματα με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και αφού τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο ώστε να δημιουργηθεί σκοτεινό περιβάλλον που θα ευνοήσει την είσοδο του αγροβακτηρίου, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης κατακόρυφα.

Ημέρα 14^η:

Αφαίρεση του αλουμινόχαρτου από τα τρυβλία.

Ημέρα 17^η:

Μεταφορά των φυτών με αναγεννημένες ρίζες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο ½ MS, MES, 1% σουκρόζη, 1% άγαρ και με pH=5,6 ρυθμισμένο μέσω KOH 1M, παρουσία επίσης, αντιβιοτικού κεφοταξίμης (C_T=300μg/ml) με σκοπό τον θάνατο των αγροβακτηρίων γύρω από τα φυτά.

Η μεταφορά των φυτών αναλυτικότερα έγινε ως εξής: Τα 8 επιμολυσμένα φυτά ενός υ, μεταφέρθηκαν σε στρογγυλό τρυβλίο Perti στο οποίο προηγουμένως είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί νοτισμένο με 1ml αποστειρωμένου ddH₂O. Τα φυτά ξεπλύθηκαν με 3ml ddH₂O και τοποθετήθηκαν στα νέο τους τρυβλίο, που σφραγίστηκε στη συνέχεια, με parafilm και στο οποίο έγιναν μερικές τρύπες μέσω αποστειρωμένης λαβίδας. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα φυτά. Στο τέλος, όλα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ξανά στον θάλαμο ανάπτυξης κατακόρυφα (22°C και 16 ώρες φως ημέρας/8 ώρες σκοτάδι).

Ημέρα 27^η:

Φύτευση των φυτών. Αναγεννημένες ρίζες διέθεταν 99 από τα 122 φυτά που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα υπερέκφρασης και 131 από τα 148 φυτά που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα control. Από αυτά φυτεύτηκαν 67 με τον φορέα υπερέκφρασης και 50 με τον φορέα control.

Τα φυτά φυτεύτηκαν σε γλάστρες που περιείχαν μίγμα άμμου/βερμικουλίτη με αναλογία 2:1. Ποτίστηκαν με διάλυμα 25% Hoaglands δίχως άζωτο, διότι στη συνέχεια ακολούθησε μόλυνση των φυτών με *Mesorhizobium loti* R7A με σκοπό την δημιουργία φυματίων και την διερεύνηση της υπερέκφρασης του γονιδίου AMY2 στη φυματιογένεση. Διότι, σε περίπτωση που το φυτό έχει άζωτο δεν χρειάζεται να σχηματίσει φυμάτια. Τα φυτά καλύφθηκαν με μεμβράνη μέχρις ότου να

συνηθίσουν τις καινούργιες συνθήκες ανάπτυξης στη γλάστρα και τοποθετήθηκαν εκ νέου στον θάλαμο ανάπτυξης.

2.13 Μόλυνση των μετασχηματισμένων φυτών *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A

Αρχικά, προετοιμάστηκε στερεή καλλιέργεια του στελέχους *Mesorhizobium loti* R7A σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο YMB και άγαρ. Το επώαστηκε στους 22°C για 3 ημέρες μέχρι την εμφάνιση αποικιών. Στη συνέχεια, έγινε μια προ-καλλιέργεια *Mesorhizobium loti* R7A σε 5ml θρεπτικού μέσου YMB και επώαστηκε στους 22°C υπό ήπια ανάδευση(150rpm) για 3 ημέρες. Έπειτα, αφού μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας(OD₆₀₀) αραιώθηκε σε αποστειρωμένο dH₂O, σε τελικό όγκο επαρκή για την μόλυνση των φυτών(1ml για την μόλυνση κάθε φυτού) , τόση ποσότητα από την καλλιέργεια μέχρι OD₆₀₀=0,6. Η αραιώση γίνεται σε dH₂O και όχι σε θρεπτικό μέσο YMB, επειδή, αν γινόταν σε YMB το *M.loti* θα προτιμούσε να χρησιμοποιήσει αυτό ως υπόστρωμα παρά να δημιουργήσει συμβιωτική σχέση με το φυτό. Τέλος, έγινε η μόλυνση των φυτών. Τα φυτά μολύνθηκαν με *M.loti* 15 ημέρες μετά την φύτευση τους σε γλάστρες. Για την μόλυνση αρχικά, με τη βοήθεια λαβίδας σκαλίστηκε η άμμος μέχρι να γίνει ορατή η ρίζα του φυτού, και έπειτα, μολύνθηκε με 1ml καλλιέργειας. Τα φυτά παρέμειναν στις γλάστρες για 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση και έπειτα, αφαιρέθηκαν από αυτές και έγινε καταγραφή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης του αριθμού των φυματίων της ρίζας.

2.14 Απομόνωση RNA με LiCl

Για την απομόνωση του RNA, από δείγματα RNA μετασχηματισμένων φυτών *L.japonicus* 21 ημέρες μετά την μόλυνση τους με *M.loti*, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του LiCl.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση του ριζικού ιστού των δειγμάτων με τη βοήθεια εμβόλου παρουσία υγρού αζώτου. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 300μl extraction buffer(50mM Tris-HCl, pH=8,3; 150mM NaCl; 10mM EDTA; 1% Lauryl sarcosine) και 300 μl διαλύματος PIC(phenol/isoamyl alcohol/chloroform αναλογίας 24:1:24 εξισορροπημένο με 100mM Tris pH=8,3/10mM EDTA). Τα δείγματα ανακινήθηκαν μηχανικά για 30sec και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 8min στα 13.000 rpm και η υδατική τους φάση μεταφέρθηκε σε νέα eppendorfs, όπου και προστέθηκε ίση ποσότητα διαλύματος PIC. Αφού, ανακινήθηκαν μηχανικά για 30sec και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000 rpm για 8min και η υδατική τους

φάση μεταφέρθηκε σε νέα *eppendorfs*. Στα δείγματα προστέθηκαν 0,1 volume 3M NaOAc(pH=5,2) και 1 volume ισοπροπανόλης και πραγματοποιήθηκε μηχανική ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 18min και αφαίρεση της υδατικής φάσης. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με 562,5μl 10T/10E(10mM Tris pH=8,3/10mM EDTA) ενώ στην συνέχεια προστέθηκαν 187,5 8M LiCl και ακολούθησε ανάδευση. Τα δείγματα επώαστηκαν overnight στους 4°C. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρήθηκαν για 18min στα 13.000 rpm. Η υδατική φάση αφαιρέθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 500μl 70% αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15min στα 13.000 rpm, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα αφού στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου για 10min επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20μl ddH₂O.

Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε ποσοτικοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Qubit και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase προκειμένου να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα γενωμικού DNA. Η κατεργασία έγινε με το kit DNase I, RNase-free της Thermo Fisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά το πέρας της κατεργασίας ελέγχθηκε η παρουσία υπολειμμάτων DNA μέσω PCR (Ενότητα 2.4).

2.15 Πειράματα RT-qPCR (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου)

Η ποσοτική PCR είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR), μέσω της χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Η χρωστική ενσωματώνεται στην αλληλουχία που ενισχύεται και ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Η παρεμβαλλόμενη σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) χρωστική παρουσιάζει ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, ενώ παράγει ποσοτική αύξηση του φθορισμού, όταν δεσμεύεται σε dsDNA.

Το σημείο/κύκλος της αντίδρασης κατά το οποίο ο ανιχνευόμενος φθορισμός από κάθε δείγμα ξεπερνά το υπόβαθρο φθορισμού ορίζεται ως «κύκλος-κατώφλι» (Threshold Cycle ή Ct) ο οποίος εξαρτάται από το ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και άρα την αρχική ποσότητα μορίων-στόχων, μήτρας, της PCR, Έτσι, όσο λιγότερα αντίγραφα μορίου-στόχου περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευθεί το παραγόμενο σήμα που αντιστοιχεί στο Ct.

Στην παρούσα εργασία η έκφραση του γονιδίου *AMY2* μετρήθηκε με σχετική ποσοτικοποίηση (RT-qPCR) μέσω του kit “Luna Universal one-step RT-q-PCR” (New England Biolabs, LOT: 0071710) σύμφωνα με της οδηγίες κατασκευαστή. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουβικουιτίνης του *L. japonicus*. Πριν την

τελική αντίδραση RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις κανονικοποίησης των δειγμάτων μόνο με το γονίδιο αναφοράς προκειμένου μετά την επιπρόσθετη επεξεργασία τους (με αραίωση) να έχουν όλα τα δείγματα τον ίδιο περίπου αριθμό Ct (~22) όσον αφορά το γονίδιο της ουβικουιλίνης. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις και για τα 2 γονίδια. Οι εκκινητές και οι συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω.

Εκκινητές:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
Εμπρόσθιος εκκινητής (RtUBQ-F)	5'-TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC-3'
Οπίσθιος εκκινητής (RtUBQ-R)	5'-CCAGAAGAGGCCACAACAAAC-3'
Εμπρόσθιος εκκινητής (RtAMY2-F)	5'-GTACAGAAATAATTTTACAACGATGG-3'
Οπίσθιος εκκινητής (RtAMY2-R)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCTTAACTGCAATGGATGGTAATGG-3

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR για το γονίδιο της ουβικουιλίνης(RtUBQ-F/R) και για το γονίδιο AMY2(RtAMY2-F/ R).

Συνθήκες ενίσχυσης:

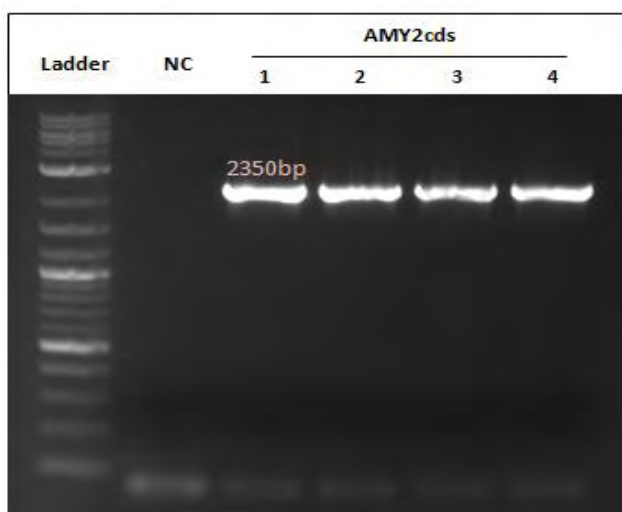
Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αντίστροφη μεταγραφή	55°C	10min	Πριν τον 1 ^ο κύκλο
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1min	
Αποδιάταξη υποστρώματος	95 °C	10sec	39 κύκλοι
Επιμήκυνση εκκινητών	60°C	30sec	
Τελική επιμήκυνση	65°C	5min	Μετά τον τελευταίο κύκλο
Melt Curve	65°C-95°C	-	Προσαύξηση 0.5°C / 5sec

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR για την σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου AMY2.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και ενίσχυση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *AMY2* μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* ενισχύθηκε μέσω PCR, από τον φορέα pYES στον οποίο ήταν ήδη κλωνοποιημένη (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003), με στόχο την υπο-κλωνοποίηση της σε δυαδικό φορέα υπερέκφρασης σε φυτά. Αρχικά, απομονώθηκε από καλλιέργεια *E. coli* με αλκαλική λύση και στη συνέχεια, ενισχύθηκε με εκκινητές (*AMY2-F-attB1* και *AMY2-R-attB2*) που εισήγαγαν στα 5' και 3' άκρα τις αλληλουχίες *attB1* και *attB2*, αντίστοιχα, για να χρησιμοποιηθεί σε κλωνοποίηση με την τεχνολογία Gateway® cloning (Ενότητα 2.10). Επιπρόσθετα, μετά την ενίσχυση της κωδικής αλληλουχίας ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (ΕΙΚΟΝΑ 10) και εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να απομακρυνθούν τα διμερή των εκκινητών.

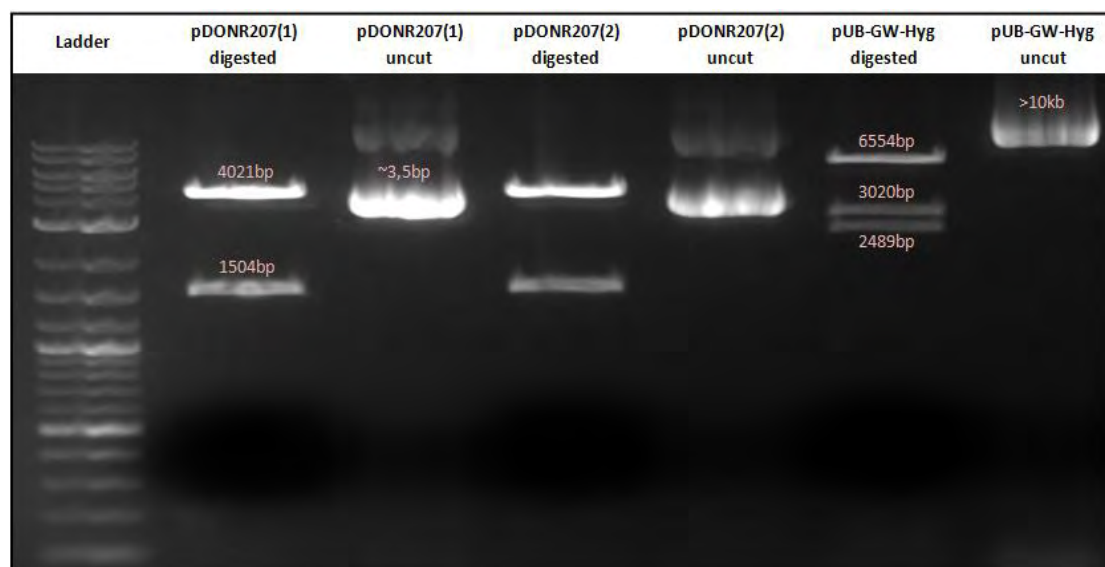


ΕΙΚΟΝΑ 10: Προϊόντα ενίσχυσης της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της *AMY2* με χρήση εκκινητών που εισάγουν στα άκρα *attB* αλληλουχίες για τη μετέπειτα κλωνοποίησή της μέσω της τεχνολογίας Gateway® cloning. Στο πρώτο πηγαδάκι απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder) ενώ, ακριβώς δίπλα με την ένδειξη NC, ο αρνητικός μάρτυρας. Στις υπόλοιπες θέσεις, στις 2350bp, εμφανίζεται η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2*.

3.2 Κατασκευή φορέα υπερέκφρασης του γονιδίου *AMY2* στο φυτό *Lotus japonicus*.

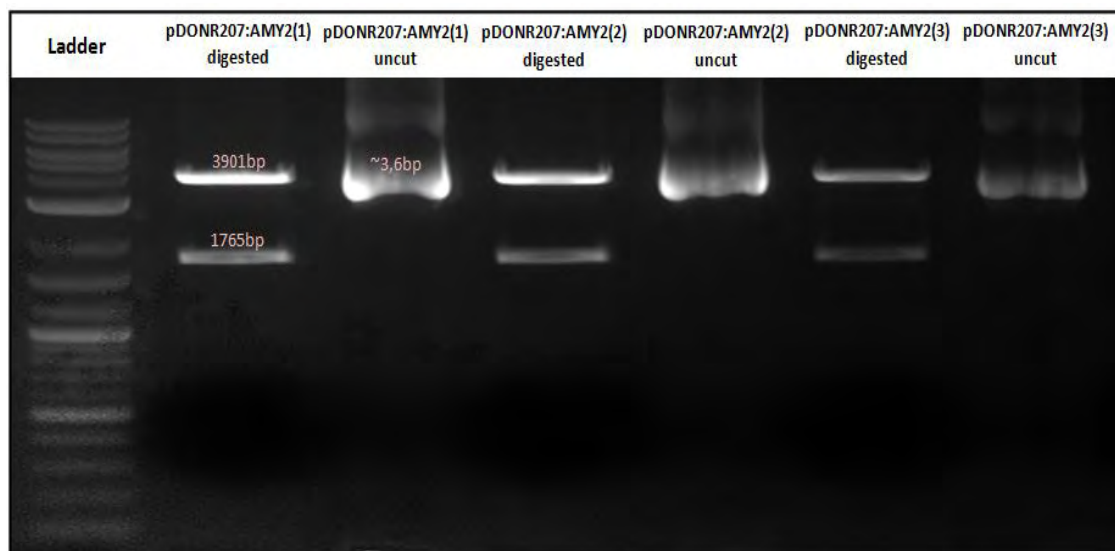
Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *AMY2* του φυτού *Lotus japonicus* μέσω του συστήματος Gateway® cloning έγινε χρήση 2 πλασμιδιακών φορέων, του φορέα pDONR207 και του φορέα pUB-GW-Hyg.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των 2 πλασμιδιακών φορέων από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* με αλκαλική λύση και στη συνέχεια ακολούθησε διαγνωστική πέψη με ένζυμο περιορισμού(ΕΙΚΟΝΑ 11). Για την πέψη του φορέα pDONR207 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμο EcoRI-HF και EcoRV-H, ενώ για τον φορέα pUB-GW-Hyg το περιοριστικό ένζυμο NdeI.



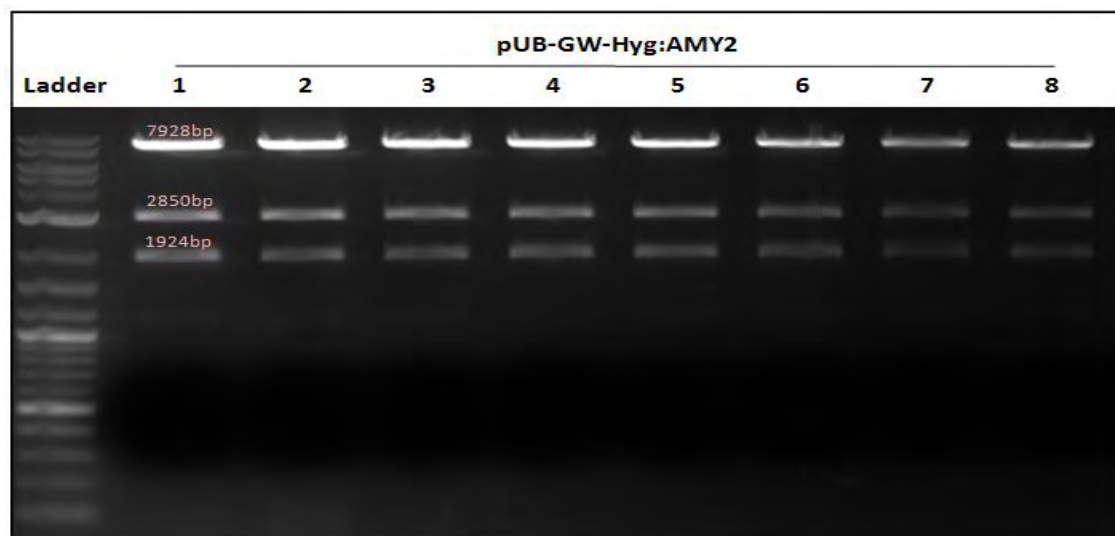
ΕΙΚΟΝΑ 11: Προϊόντα απομόνωσης και πέψης των φορέων pDONR207 και pUB-GW-Hyg. Στο πρώτο πηγαδάκι εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στις θέσεις 3 και 5, περίπου στις 3,5kb, απεικονίζεται ο φορέας pDONR207 έπειτα από την απομόνωση του, ενώ στις θέσεις 2 και 4 ο φορέας pDONR207 έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI-HF και EcoRV-HF. Από την πέψη του προκύπτουν 2 ζώνες στα 4021bp και στα 1504bp. Στη θέση 7 και με μέγεθος >10kb απεικονίζεται ο φορέας pUB-GW-Hyg έπειτα από την απομόνωση του, ενώ στη θέση 6 εμφανίζεται ο ίδιος φορέας έπειτα από πέψη με το ένζυμο NdeI. Από την πέψη του, προκύπτουν ζώνες στα 6554bp, στα 3020bp και στα 2489bp.

Έπειτα, η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* κλωνοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης της BP κλωνάσης του συστήματος Gateway® cloning στον φορέα pDONR207 προς σχηματισμό entry clone(pDONR207:AMY2) και ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* στελέχους DH5a. Αποικίες προέκυψαν μόνο από τα δεκτικά κύτταρα στα οποία εισήλθε ο φορέας pDONR207:AMY2, ενώ εκείνα που μετασχηματίστηκαν με τον άδειο φορέα pDONR207 δεν έδωσαν αποικίες λόγω της παραγωγής της πρωτεΐνης CcdB. Η CcdB είναι μία υπομονάδα της DNA γυράσης η οποία στην απουσία της άλλης υπομονάδας CcdA προκαλεί ρήγματα στο DNA που δεν μπορεί να επιδιορθώσει και παραμένει δεσμευμένη σ' αυτό οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Μετά, πραγματοποιήθηκε διαλογή των αποικιών που προέκυψαν μέσω διαγνωστικών πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI-HF και EcoRV-HF(ΕΙΚΟΝΑ 12), για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *AMY2* στον φορέα pDONR207.



ΕΙΚΟΝΑ 12: Διαλογή αποικιών έπειτα από κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *AMY2* στον φορέα pDONR207 μέσω της αντίδρασης της BP κλωνάσης του συστήματος Gateway® cloning. Στο πρώτο πηγαδάκι εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στις θέσεις 3, 5 και 7, περίπου στις 3,6kb, απεικονίζεται ο φορέας pDONR207:AMY2 έπειτα από την απομόνωση του ενώ στις θέσεις 2, 4 και 6 απεικονίζεται ο φορέας pDONR207:AMY2 έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI-HF και EcoRV-HF. Από την πέψη του προκύπτουν 2 ζώνες στα 3901bp και στα 1765bp.

Στη συνέχεια, μέσω της αντίδρασης LR κλωνάσης του συστήματος Gateway® cloning η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2* μεταφέρθηκε από τον φορέα pDONR207:AMY2 στο φορέα pUB-GW-Hyg προς σχηματισμό του φορέα υπερέκφρασης(expression clone) pUB-GW-Hyg:AMY2 που χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα, για τον μετασχηματισμό των φυτών *Lotus japonicus*. Ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* στελέχους DH5a και διαλογή των αποικιών που προέκυψαν μέσω διαγνωστικών πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα PspXI και XbaI(ΕΙΚΟΝΑ 13).

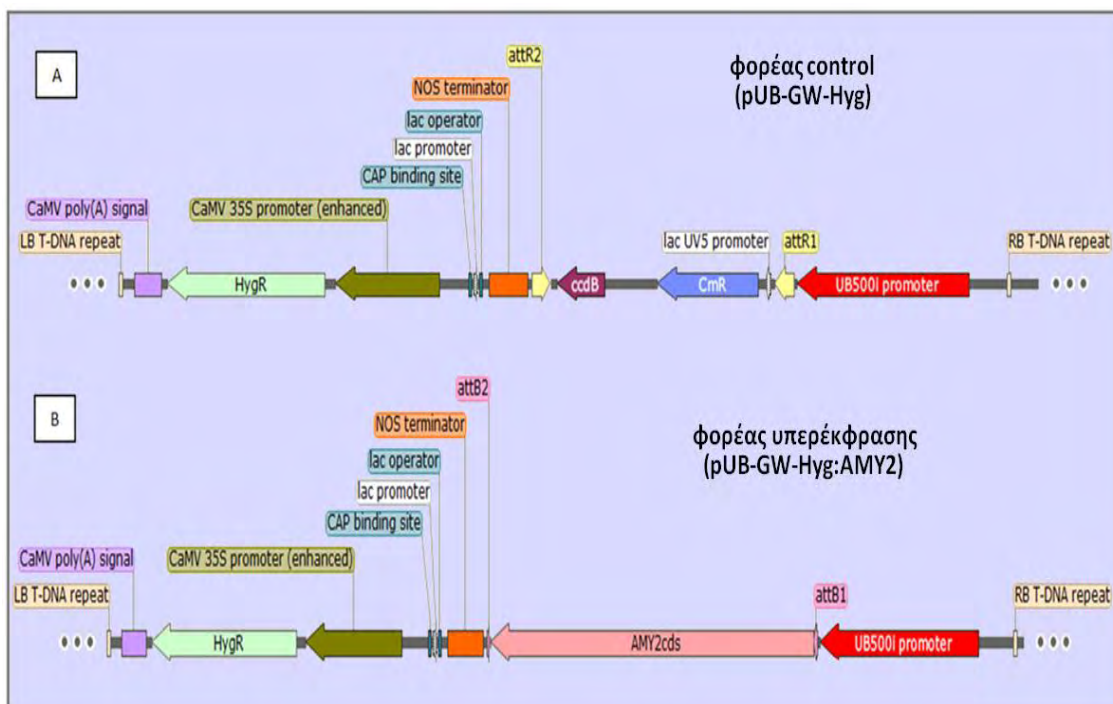


ΕΙΚΟΝΑ 13: Διαλογή αποικιών έπειτα από κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της *AMY2* στον φορέα pUB-GW-Hyg μέσω της αντίδρασης της LR κλωνάσης του συστήματος Gateway® cloning. Στο πρώτο πηγαδάκι εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους(Ladder). Στις θέσεις 1 έως 8 απεικονίζεται ο φορέας pUB-GW-Hyg:AMY2 έπειτα από

πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα PspXI και XbaI. Από την πέψη του προκύπτουν 3 ζώνες στα 7928bp, στα 2850bp και στα 1924bp.

Συνεπώς, η κωδική αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στο δυαδικό φορέα pUB-GW-Hyg(EIKONA 14) έχοντας ως υποκινητή για την εκφρασή της, τον υποκινητή του γονιδίου της ουβικουτίνης του φυτού *L. japonicus*(UB500i promoter). Επίσης, μεταξύ του δεξιού και αριστερού συνοριακού άκρου του ενθέματος του T-DNA του φορέα υπερέκφρασης περιλαμβάνεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη(HygR) ως δείκτης επιλογής έχοντας ως υποκινητή τον CaMV 35S.

Το τρέχον μοντέλο για την μεταφορά του T-DNA προβλέπει ότι αυτό ενσωματώνεται πάντα πρώτα με το δεξί συνοριακό και έπειτα με το αριστερό, οπότε για να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση ολόκληρου του T-DNA, τα γονίδια επιλογής τοποθετούνται δίπλα στο αριστερό συνοριακό και ακολουθεί η κατασκευή πιο κοντά στο δεξί συνοριακό.



EΙΚΟΝΑ 14: Απεικόνιση της περιοχής του T-DNA: A) του φορέα control(pUB-GW-Hyg) και B) του φορέα υπερέκφρασης(pUB-GW-Hyg:AMY2). Συντομογραφίες: *AMY2cds*, κωδική αλληλουχία του γονιδίου *AMY2*; UB500i promoter, υποκινητής του γονιδίου της ουβικιτίνης του φυτού *Lotus japonicus*; NOS terminator, αλληλουχία τερματισμού; *CmR*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη; *ccdB*, γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CcdB που αποτελεί παρεμποδιστή της DNA γυράσης στο *E.coli*; *HygR*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη; RB/LB T-DNA repeat, δεξί/αριστερό συνοριακό άκρο; *attR1* και *attR2*, αλληλουχίες απαραίτητες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης της BP κλωνάσης; *attB1* και *attB2*, αλληλουχίες απαραίτητες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης της LR κλωνάσης του συστήματος Gateway® cloning.

3.3 Hairy-roots μετασχηματισμός των φυτών *Lotus japonicus* με το στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334

Έπειτα, από την κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *AMY2* στον φορέα pUB-GW-Hyg ακολούθησε άμεσος μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334 με το φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2, καθώς και με τον φορέα control pUB-GW-Hyg.

Τα μετασχηματισμένα δεκτικά κύτταρα που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση και τον επακόλουθο μετασχηματισμό των φυτών *Lotus japonicus* (Ενότητα 2.12). Από τα φυτά που μετασχηματίστηκαν προέκυψαν αναγεννημένες ρίζες (ΕΙΚΟΝΑ 15). Πιο συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των φυτών *Lotus japonicus* που μολύνθηκαν με τα μετασχηματισμένα κύτταρα του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334, το ποσοστό των φυτών που παρατηρήθηκε η δημιουργία κάλλου προς τα μολυσμένα φυτά και το ποσοστό των φυτών με αναγεννημένες ρίζες προς τα μολυσμένα φυτά.

Τύπος φυτών	Συνολικός αριθμός φυτών που μολύνθηκαν	Αριθμός φυτών με αναγεννημένες ρίζες/μολυσμένα φυτά %	Αριθμός φυτών με κάλλο/μολυσμένα φυτά %
control φυτά	148	88,5% (131/148)	97,9% (145/148)
AMY2 φυτά	122	81,1% (99/122)	95,9% (117/122)

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Απεικονίζεται ο συνολικός αριθμός των φυτών *Lotus japonicus* που μολύνθηκαν με τα μετασχηματισμένα κύτταρα του στελέχους *A.rhizogenes* LBA1334, το ποσοστό των φυτών που παρατηρήθηκε η δημιουργία κάλλου προς τα μολυσμένα φυτά και το ποσοστό των φυτών με αναγεννημένες ρίζες προς τα μολυσμένα φυτά.



ΕΙΚΟΝΑ 15: Αντιπροσωπευτικές εικόνες αναγεννημένων ριζών σε φυτά *Lotus japonicus* 14dpi με στέλεχος *A.rhizogenes* LBA1334 μετασχηματισμένο με τον φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις αναγεννημένες ρίζες του φυτού ενώ το γαλάζιο βέλος το σημείο του υποκοτυλίου που κόπηκε με νυστέρι για να πραγματοποιηθεί η μόλυνση.

Φυτά με αναγεννημένες ρίζες μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με άμμο και βερμικουλίτη (αναλογίας 2:1) για 2 εβδομάδες και ακολούθως μολύνθηκαν με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A αγρίου τύπου προς ανάπτυξη συμβιωτικής σχέσης και δημιουργίας φυματίων. Για την ακρίβεια, φυτεύτηκαν 50 φυτά control και 67 φυτά AMY2 με αναγεννημένη ρίζα.

Τα φυτά μετά την μόλυνση παρέμειναν συνολικά 3 εβδομάδες στις γλάστρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν, παρατηρήθηκαν κάτω από το στερεοσκόπιο για την ανίχνευση ή μη φυματίων και για τυχόν μορφολογικές διαφορές αυτών, ενώ επίσης, καταγράφηκαν τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά (μήκος ρίζας/υπέργειου τμήματος, βάρος ρίζας, αριθμός φυματίων).

3.4 Έλεγχος επιτυχούς μετασχηματισμού φυτών *Lotus japonicus*

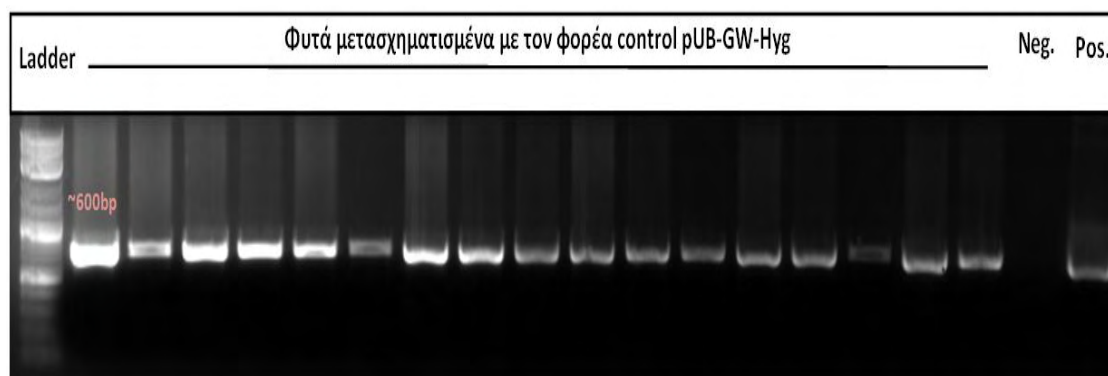
Τα φυτά μετά την συλλογή τους υποβλήθηκαν σε εξαγωγή DNA από ιστούς ρίζας ώστε να ελεγχθεί και να διαπιστωθεί ο επιτυχής μετασχηματισμός τους και η επακόλουθη ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδιωμά τους.

Ο έλεγχος του μετασχηματισμού έγινε μέσω PCR με εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο επιλογής στην υδρομυκίνη που βρίσκεται στο T-DNA. Το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης ήταν περίπου 600bp. Όσα φυτά έδωσαν το επιθυμητό προϊόν με αυτή τη μέθοδο θεωρήθηκαν θετικά μετασχηματισμένα. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

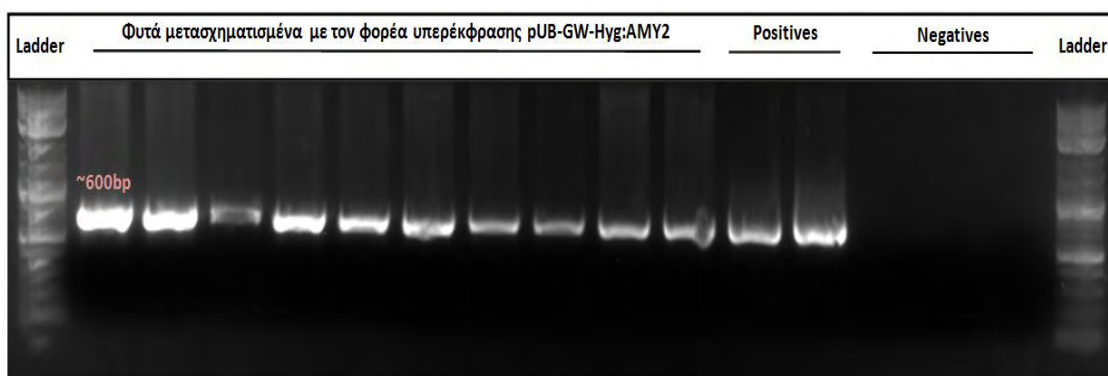
Τύπος φυτών	Σύνολο φυτών που συλλέχθηκαν μετά την μόλυνση	Αριθμός θετικά μετασχηματισμένων φυτών/σύνολο φυτών που ελέγχθηκαν %
control φυτά	67	98,5% (66/67)
AMY2 φυτά	50	98% (49/50)

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Απεικονίζεται ο συνολικός αριθμός των φυτών που συλλέχθηκαν μετά την μόλυνση και το ποσοστό των θετικά μετασχηματισμένων φυτών προς το σύνολο των φυτών που ελέγχθηκαν.

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται ενδεικτικά ορισμένα αποτελέσματα των PCR στα δείγματα τόσο των control φυτών που μετασχηματίστηκαν (ΕΙΚΟΝΑ 16) όσο και εκείνων που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα υπερέκφρασης (AMY2 φυτά; ΕΙΚΟΝΑ 17).



ΕΙΚΟΝΑ 16: Έλεγχος επιτυχούς μετασχηματισμού των φυτών *Lotus japonicus*. Το αναμενόμενο προϊόν είναι ~600bp και οφείλεται στην ενίσχυση του γονιδίου επιλογής στην υδρομυκίνη που εντοπίζεται στο εσωτερικό του T-DNA. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους ενώ στις θέσεις 2-18 εντοπίζονται θετικά μετασχηματισμένα φυτά με τον φορέα control pUB-GW-Hyg. Τέλος, στις θέσεις 19 και 20 απεικονίζονται ο αρνητικός(ddH₂O) και ο θετικός(πλασμίδιο pUB-GW-Hyg) μάρτυρας.



ΕΙΚΟΝΑ 17: Προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου επιλογής στην υδρομυκίνη στην προσπάθεια για έλεγχο επιτυχούς μετασχηματισμού των φυτών *Lotus japonicus*. Το αναμενόμενο προϊόν είναι ~600bp. Στις θέσεις 1 και 17 βρίσκεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στις θέσεις 2-11 εντοπίζονται θετικά μετασχηματισμένα φυτά με τον φορέα υπερέκφρασης pUB-GW-Hyg:AMY2 ενώ στις θέσεις 12 και 13 υπάρχουν θετικοί μάρτυρες(πλασμίδια pUB-GW-Hyg). Τέλος, στις θέσεις 14-16 βρίσκονται αρνητικοί μάρτυρες(ddH₂O).

Μετά τον έλεγχο μετασχηματισμού ακολούθησε εξαγωγή RNA από τα θετικά μετασχηματισμένα φυτά και αντίδραση DNase για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA. Η πλήρης απομάκρυνση του DNA επιβεβαιώθηκε μέσω PCR ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικουιτίνης του *Lotus japonicus*. Η απουσία ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της PCR υποδεικνύει την μη ύπαρξη DNA στα δείγματα.

3.5 Έλεγχος της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *LjAMY2* σε θετικά μετασχηματισμένες ρίζες φυτών *L. japonicus*.

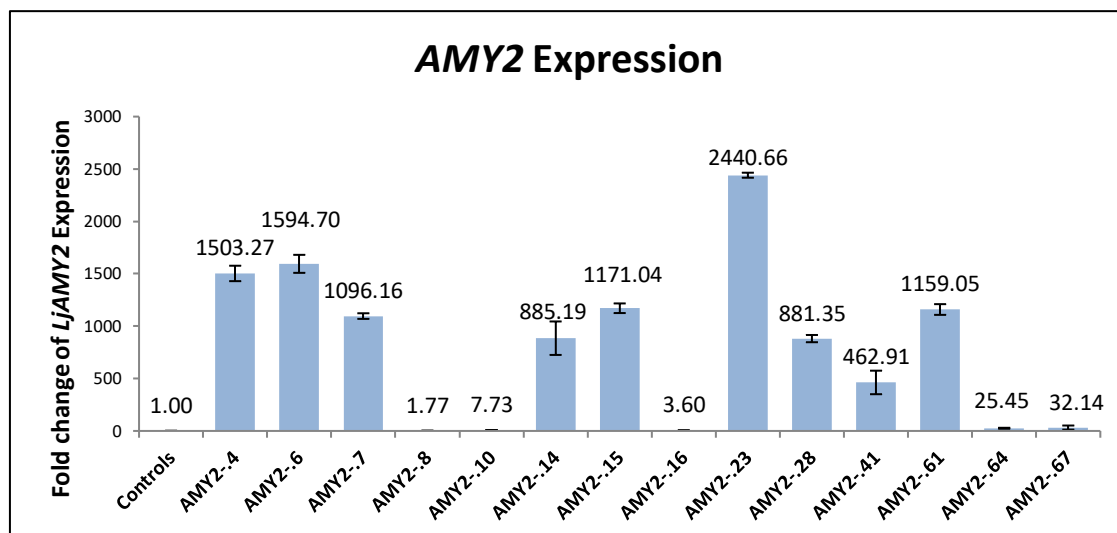
Για να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου *LjAMY2*, σε μεταγραφικό επίπεδο, στις μετασχηματισμένες ρίζες των φυτών *L. japonicus* 21 ημέρες μετά την μόλυνση με το *Mesorhizobium loti*, χρησιμοποιήθηκε RT-qPCR. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουβικουιλίνης του *L. japonicus*.

Συνολικά διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε 24 θετικά μετασχηματισμένα με το φορέα υπερέκφρασης φυτά. Από αυτά, τα 23 βρέθηκαν να υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο σε σχέση με τα φυτά control. Το ποσοστό υπερέκφρασης ανέρχεται σε 95,8%.

Στο ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1 παρατίθενται αποτελέσματα από ορισμένα($n=10$) φυτά που ελέγχθηκαν. Για την ακρίβεια περιλαμβάνονται 14 *AMY2* φυτά, που όλα εμφανίζουν υπερέκφραση σε σχέση με τα controls($n=5$). Όπως διαπιστώνεται και στο διάγραμμα δεν επιτεύχθηκε σε όλα τα δείγματα ριζών ο ίδιος βαθμός υπερέκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά($n=9$) 4, 6, 7, 14, 15, 23, 28, 41, 61 παρατηρείται τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου *AMY2*, της τάξης >450 fold, με τα περισσότερα από αυτά να εμφανίζουν >1000 fold αύξηση σε σχέση με τα controls. Ωστόσο, εντοπίζονται και φυτά(*AMY2*-8, 10, 16, 64 και 67) με πολύ μικρότερη υπερέκφραση σε σχέση με τα πιο πάνω φυτά, μεταξύ 1,77 και 32,14 fold change.

Πανομοιότυπα αποτελέσματα παρατηρούνται και στα υπόλοιπα φυτά που ελέγχθηκαν(ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 στο παράρτημα). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι μόλις 1 από τα 24 φυτά(4,1%) που ελέγχθηκαν παρουσίαζε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, σε μεταγραφικό επίπεδο, του γονιδίου *AMY2* σε σύγκριση με τα controls. Το φυτό αυτό εντοπίζεται στο ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 στο παράρτημα.

Συνολικά, από τα 24 *AMY2* φυτά, τα 23 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα εκ των οποίων, τα 15 παρουσίαζαν τεράστια υπερέκφραση και τα 8 χαμηλή υπερέκφραση, ενώ μόλις ένα είχε φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης.

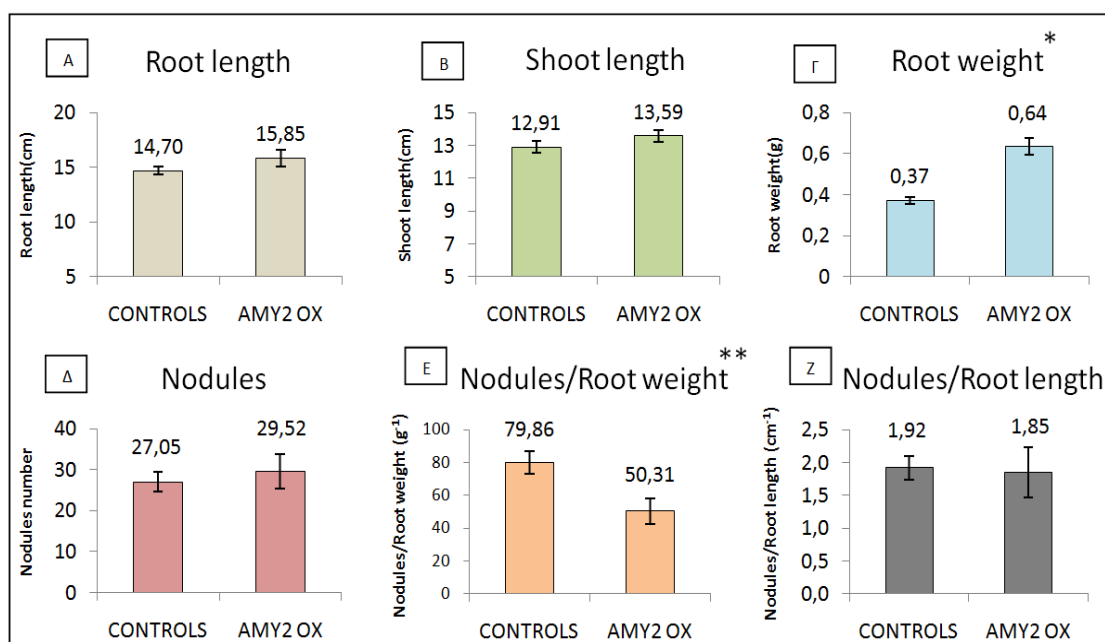


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε ρίζες φυτών *Lotus japonicus* θετικά μετασχηματισμένων με τον φορέα υπερέκφρασης, 21 ημέρες μετά την μόλυνση με το ριζόβιο *M.loti* σε σύγκριση με τα φυτά control, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR. Για τα control φυτά παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση πέντε βιολογικών δειγμάτων ($n=5$), για τα υπόλοιπα ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση δύο τεχνικών επαναλήψεων της RT-qPCR.

Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω σύγκριση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ των θετικά μετασχηματισμένων φυτών και των controls. Εξετάστηκαν ο μέσος όρος του μήκους και βάρους της ρίζας, ο μέσος όρος του μήκους του βλαστού, ο απόλυτος αριθμός και η μορφολογία των φυματίων, καθώς και ο αριθμός φυματίων ανά εκατοστό και ανά γραμμάριο ρίζας.

Στα διαγράμματα της εικόνας 18, παρατίθενται τα αποτελέσματα της σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Όπως διακρίνεται από αυτά, φυτά με αυξημένη έκφραση του γονιδίου *AMY2* εμφάνισαν στατιστικά πολύ σημαντικά ($p<0,0001$) αυξημένο βάρος ρίζας σε σχέση με τα control φυτά, σχεδόν διπλάσιο του φυσιολογικού (0,64 έναντι 0,37; ΕΙΚΟΝΑ 18-Γ). Τα φυτά αυτά διέθεταν δηλαδή, πιο σγουρή και πυκνά διακλαδισμένη ρίζα. Το παραπάνω εύρημα σε συνδυασμό με το διάγραμμα του αριθμού των φυματίων (ΕΙΚΟΝΑ 18-Δ) στο οποίο αποτυπώνεται η έλλειψη στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ του απόλυτου αριθμού των φυματίων στις δύο κατασκευές, οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα φυτά με υπερέκφραση (*AMY2* φυτά) διαθέτουν μικρότερο αριθμό φυματίων ως προς το βάρος της ρίζας. Αυτό επιβεβαιώνεται από το αντίστοιχο διάγραμμα (ΕΙΚΟΝΑ 18-Ε), όπου και η μεταξύ τους διαφορά βρέθηκε στατιστικώς σημαντική ($p<0,05$). Ωστόσο, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο κατασκευών στο μήκος ρίζας (ΕΙΚΟΝΑ 18-Α) και βλαστού (ΕΙΚΟΝΑ 18-Β) και στον αριθμό των φυματίων ανά cm ρίζας (ΕΙΚΟΝΑ 18-Ζ). Να τονιστεί ότι η εξωτερική μορφολογία των φυματίων δεν διέφερε μεταξύ των control και των υπερεκφρασμένων φυτών, καθώς παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό ροζ χρώμα των

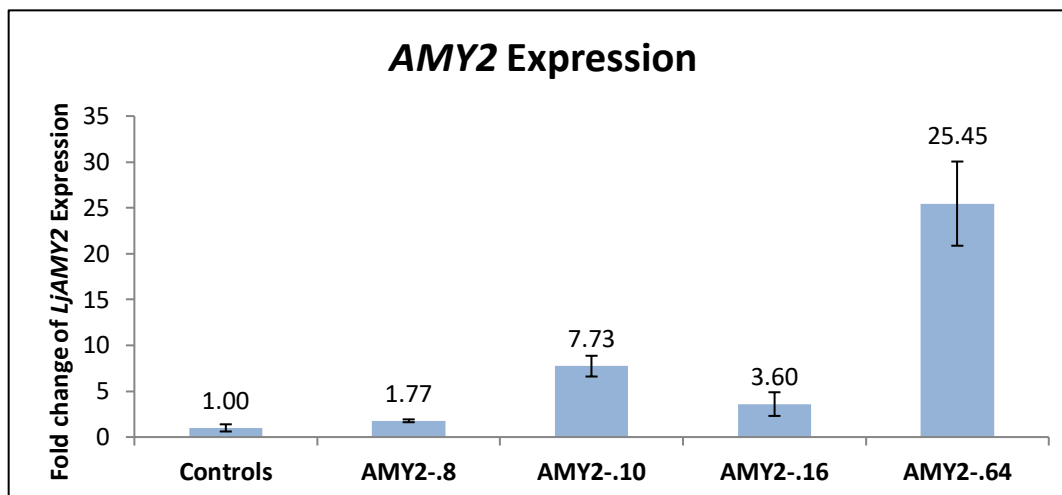
λειτουργικών φυματίων, ενώ μερικά φυτά και των δυο κατηγοριών διέθεταν πέραν των ροζ και λευκά/κίτρινα, δηλαδή ανώριμα, φυμάτια.



ΕΙΚΟΝΑ 18: Διαγράμματα απεικόνισης της σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ φυτών με υπερέκφραση του γονιδίου *AMY2* (*AMY2 OX*; $n=23$) και φυτών ελέγχου (*CONTROLS*; $n=44$). Διαγράμματα σύγκρισης μέσου όρου: Α) μήκους ρίζας (cm), Β) μήκους βλαστού (cm), Γ) βάρους ρίζας (g), Δ) απόλυτου αριθμού φυματίων, Ε) αριθμού φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας, Ζ) αριθμού φυματίων ανά εκατοστό ρίζας. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. *: Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά (p -value $<0,0001$) και **: Στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value $<0,05$) σε δοκιμασία Student's t-test.

Όπως ειπώθηκε και στην αρχή της ενότητας, κατά την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *AMY2*, παρατηρήθηκαν δύο πολύ διαφορετικά πρότυπα υπερέκφρασης. Τα φυτά με την τεράστια υπερέκφραση και εκείνα με την χαμηλή υπερέκφραση συγκριτικά με τα πρώτα. Η εμφανής κατηγοριοποίηση των φυτών *AMY2* σε αυτές τις δύο ομάδες προκάλεσε μεγάλο ενδιαφέρον για τη διαπίστωση της ύπαρξης ή μη, ομοιογένειας μεταξύ αυτών ως προς τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά και αν συμφωνούν με τα συγκριτικά αποτελέσματα του συνόλου των φυτών *AMY2*. Αυτό αποτέλεσε και το λόγο της επιπρόσθετης διερεύνησης. Για την ακρίβεια, συγκρίθηκαν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυτών ελέγχου, ξεχωριστά, με κάθε μία από τις δύο ομάδες φυτών με υπερέκφραση που προέκυψαν.

Η ομάδα των φυτών ($n=8$) με χαμηλή υπερέκφραση (*Low AMY2 OX* φυτά) εμφάνισε αύξηση των επιπέδων του γονιδίου *AMY2* της τάξης του 1,77 - 94,5 fold change σε σχέση με τα control (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4 στο παράρτημα).

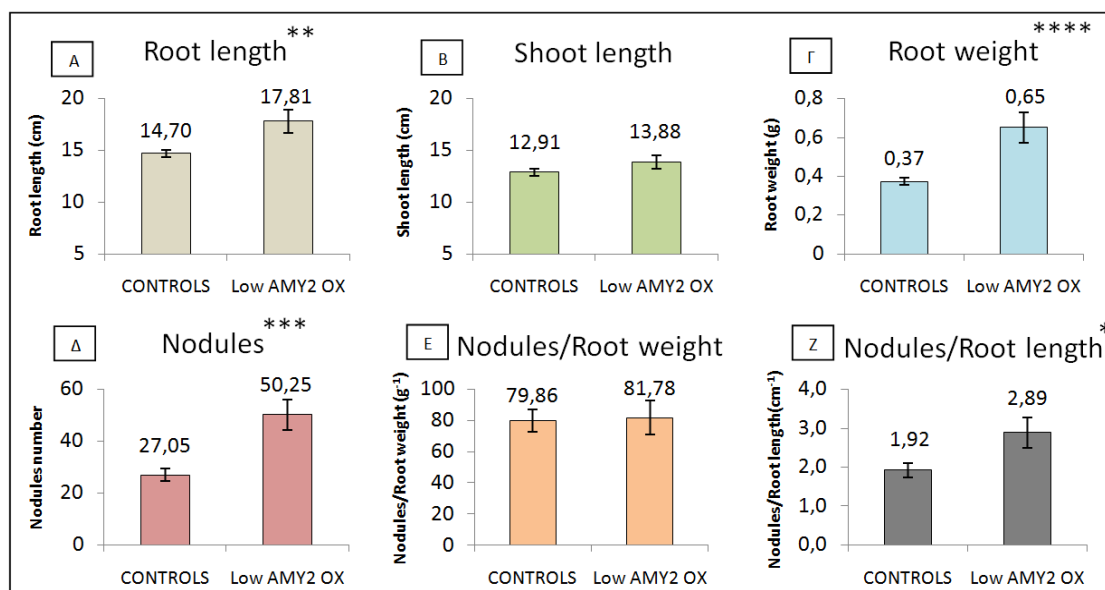


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε ορισμένα από τα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση που ανιχνεύθηκαν, σε σύγκριση με τα φυτά control, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR. Για τα control φυτά παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση πέντε βιολογικών δειγμάτων ($n=5$), για τα υπόλοιπα ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση δύο τεχνικών επαναλήψεων της RT-qPCR.

Η ανάλυση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ των φυτών ελέγχου($n=44$) και των Low *AMY2* ΟΧ φυτών($n=8$) που παρουσιάζονται στην εικόνα 19, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά(p -value $<0,0001$) του μέσου όρου βάρους της ρίζας(ΕΙΚΟΝΑ 19-Γ), με τα δεύτερα να έχουν σχεδόν διπλάσιο βάρος από το φυσιολογικό(0,65 έναντι 0,37 g), διαθέτοντας πιο διακλαδισμένη ρίζα. Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά(p -value $<0,001$), εμφανίζει και ο μέσος όρος του αριθμού των φυματίων με τα Low *AMY2* ΟΧ φυτά να διαθέτουν διπλάσιο αριθμό φυματίων(50,25 έναντι 27,05; ΕΙΚΟΝΑ 19-Δ). Ακόμα, σημαντική διαφορά(p -value $<0,01$), παρατηρείται στο μήκος της ρίζας, με τα φυτά *AMY2* να έχουν μεγαλύτερο μήκος(17,8 έναντι 14,7 cm, ΕΙΚΟΝΑ 19-Α) και στον αριθμό φυματίων ανά μήκος ρίζας(p -value $<0,05$; ΕΙΚΟΝΑ 19-Ζ) όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα διαγράμματα. Διαφορές δεν παρατηρήθηκαν στο μήκος βλαστού και στον αριθμό φυματίων ανά gr ρίζας(ΕΙΚΟΝΑ 19-Β/Ε αντίστοιχα), αλλά ούτε και στη μορφολογία των φυματίων.

Βασίζόμενοι στα άνωθι, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι κατά πάσα πιθανότητα, τα Low *AMY2* ΟΧ φυτά εμφανίζουν ένα “φαινότυπο ρίζας”, διαθέτοντας μεγαλύτερη σε μήκος και βάρος ρίζα σε σχέση με τα control και όχι τόσο ένα “φαινότυπο φυματίων”, παρά την στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται στον απόλυτο αριθμό αυτών διότι κατά την κανονικοποίηση τους ως προς το βάρος της ρίζας, η διαφορά αυτή χάνεται πλήρως. Συνεπώς τα παραπάνω αποτυπώνονται ως

την ύπαρξη μιας πιο μακριάς και διακλαδισμένης ρίζας των φυτών Low AMY2 OX με παρόμοιο αριθμό φυματίων ανά βάρος ρίζας με τα φυτά ελέγχου. Ωστόσο, καλό είναι να επισημανθεί ότι η μέτρηση του μήκους ρίζας, ιδίως μια τόσο μικρή 3cm στα 14-17 άσχετα με το πόσο σημαντική, είναι επισφαλής σε hairy roots που δεν έχουν ίδιο σημείο εκκίνησης, ρυθμό ανάπτυξης και που καμία δεν είναι ακριβώς κύρια ρίζα όπως σ' ένα κανονικό φυτό. Τουναντίον, η μέτρηση μάζας είναι πολύ καλύτερη ένδειξη μεγέθους γιατί αντιπροσωπεύει βιομάζα+νερό της ρίζας.



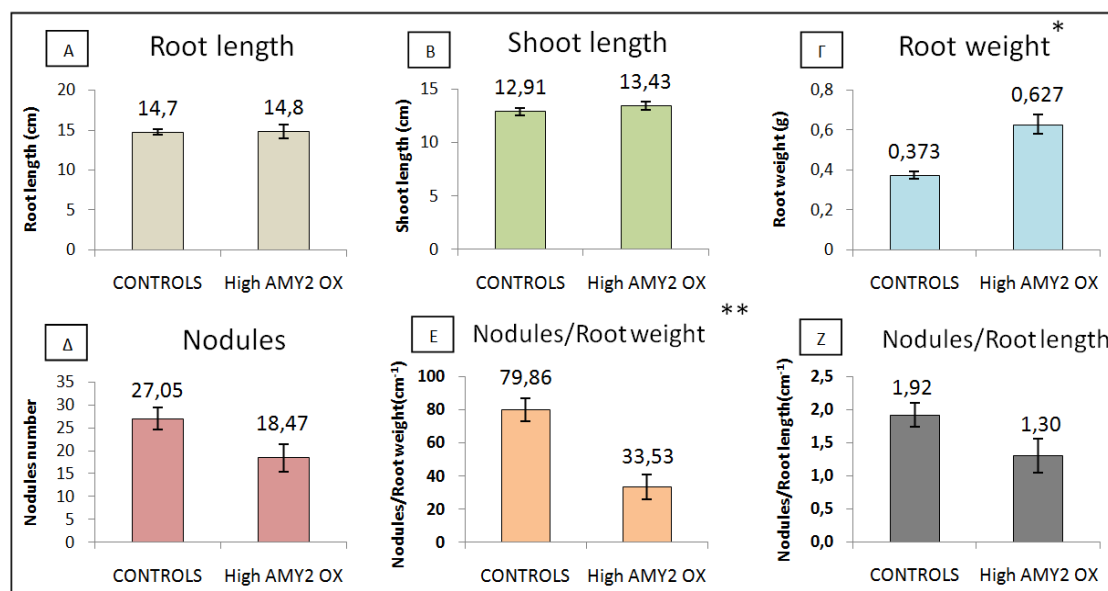
ΕΙΚΟΝΑ 19: Διαγράμματα απεικόνισης της σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ φυτών με χαμηλή υπερэкφραση του γονιδίου AMY2 (Low AMY2 OX; $n=8$) και φυτών ελέγχου (CONTROLS; $n=44$). Διαγράμματα σύγκρισης μέσου όρου: Α) μήκος ρίζας (cm), Β) μήκος βλαστού (cm), Γ) βάρος ρίζας (g), Δ) απόλυτου αριθμού φυματίων, Ε) αριθμού φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας, Ζ) αριθμού φυματίων ανά εκατοστό ρίζας. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value $<0,05$), **: Στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value $<0,01$), ***: Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά (p -value $<0,001$) και ****: Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά (p -value $<0,0001$) σε δοκιμασία Student's t-test.

Από την άλλη, υπάρχει η ομάδα των φυτών ($n=15$) με τεράστια υπερэкφραση (High AMY2 OX φυτά) που εμφάνισε αύξηση των επιπέδων του γονιδίου AMY2 >1000 fold, κατά κύριο λόγο, σε σχέση με τα control (ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 στο παράρτημα).

Η φαινοτυπική ανάλυση αυτών σε σχέση με τα φυτά ελέγχου (ΕΙΚΟΝΑ 20), έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά (p -value $<0,0001$) ως προς τον μέσο όρο του βάρους της ρίζας, με τα υπερεκφρασμένα φυτά να έχουν σχεδόν διπλάσιο βάρος (0,63 έναντι 0,37 g; ΕΙΚΟΝΑ 20-Γ). Επιπρόσθετα, στατιστικά πολύ σημαντικός (p -value $<0,001$) εντοπίζεται ο αριθμός των φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας μεταξύ των High AMY2 OX φυτών και των control, με τα πρώτα να εμφανίζουν

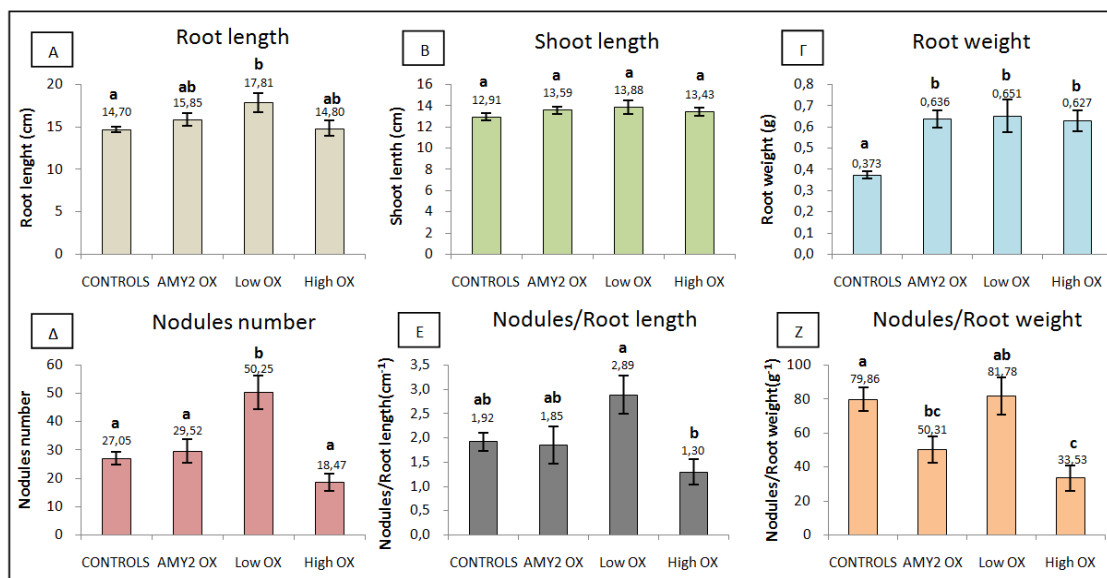
πολύ μικρότερο μέσο όρο(34 έναντι 80; ΕΙΚΟΝΑ 20-Ε). Το μήκος του βλαστού και της ρίζας, ο απόλυτος αριθμός φυματίων και ο αριθμός φυματίων ανά cm ρίζας(ΕΙΚΟΝΑ 20-Β/Α/Δ/Ζ αντίστοιχα), δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ενώ η μορφολογία των φυματίων ήταν πανομοιότυπη.

Όπως και στην περίπτωση των Low AMY2 OX φυτών έχουμε “φαινότυπο ρίζας”, με τα AMY2 φυτά να διαθέτουν διπλάσια σε βάρος ρίζα συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες(CONTROL).



ΕΙΚΟΝΑ 20: Διαγράμματα απεικόνισης της σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ φυτών με τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου AMY2(High AMY2 OX; $n=15$) και φυτών ελέγχου(CONTROLS; $n=44$). Διαγράμματα σύγκρισης μέσου όρου: Α) μήκους ρίζας(cm), Β) μήκους βλαστού(cm), Γ) βάρους ρίζας(g), Δ) αριθμού φυματίων, Ε) αριθμού φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας, Ζ) απόλυτου αριθμού φυματίων ανά εκατοστό ρίζας. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. *: Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά(p -value $<0,0001$) και **: Στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά(p -value $<0,001$) σε δοκιμασία Student's t-test.

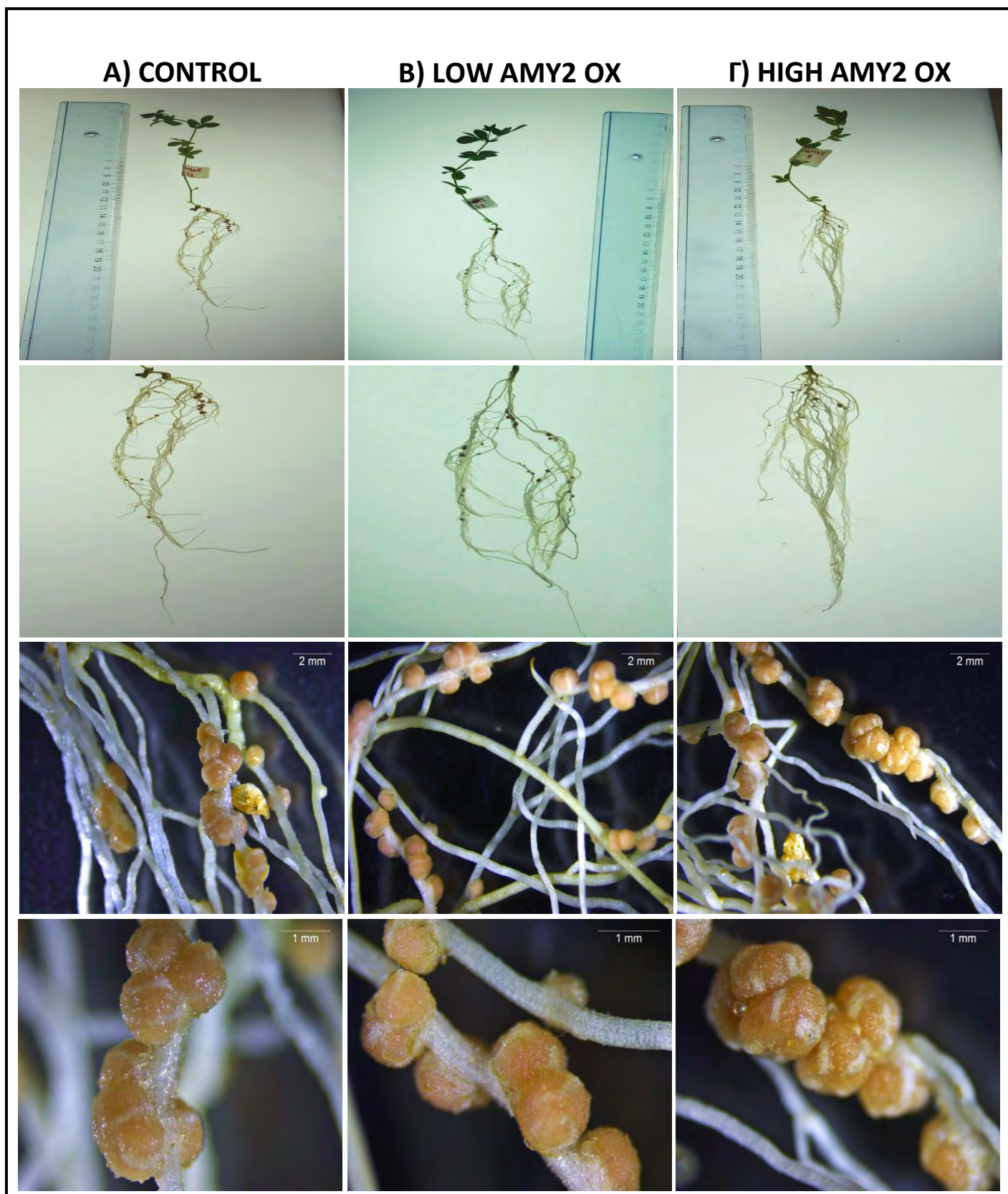
Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών επαληθεύτηκαν στατιστικά, εκτός από τη δοκιμασία Student's t-test και με τη χρήση της μεθόδου ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD όπως φαίνεται και στην εικόνα 21.



ΕΙΚΟΝΑ 21: Διαγράμματα απεικόνισης της σύγκρισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ των φυτών ελέγχου (CONTROLS; $n=44$), του συνόλου των φυτών που υπερεκφράζουν το γονίδιο AMY2 (AMY2 OX; $n=23$), των φυτών με χαμηλή υπερέκφραση του γονιδίου (Low OX; $n=15$) και των φυτών με τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου AMY2 (High OX; $n=15$). Διαγράμματα σύγκρισης μέσου όρου: Α) μήκους ρίζας (cm), Β) μήκους βλαστού (cm), Γ) βάρους ρίζας (g), Δ) απόλυτου αριθμού φυματίων, Ε) αριθμού φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας, Ζ) αριθμού φυματίων ανά εκατοστό ρίζας. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για κάθε φαινοτυπικό χαρακτηριστικό χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD. Τα μικρά γράμματα υποδεικνύουν ομάδες σημαντικότητας, με τα διαφορετικά γράμματα να υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$, Tukey's HSD).

Καταληκτικά, τα αποτελέσματα τόσο του συνόλου των υπερεκφρασμένων φυτών, όσο και των δύο ομάδων με τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης συνηγορούν στην ύπαρξη “φαινοτύπου ρίζας” σε όλα τα υπερεκφρασμένα φυτά. Ωστόσο, η μεγάλη διαφορά, έγκειται στο γεγονός ότι η αύξηση του βάρους (2x) και του μήκους της ρίζας στα Low AMY2 OX φυτά συνοδεύεται από την αντίστοιχη αύξηση και στον αριθμό των φυματίων, έχοντας τον ίδιο αριθμό φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας με τα controls. Σε αντίθεση, η αύξηση του βάρους (2x) στα High AMY2 OX φυτά, σε συνδυασμό με την απουσία σημαντικής διαφοράς ως προς τον απόλυτο αριθμό φυματίων οδηγεί σε πολύ μικρότερο αριθμό φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας συγκριτικά με τα control φυτά.

Επομένως, οι ρίζες των Low AMY2 OX φυτών είναι πιο πυκνές (branching) και μακριές με διπλάσιο απόλυτο αριθμό φυματίων αλλά πανομοιότυπο ανά γραμμάριο ρίζας. Ενώ, οι ρίζες των High AMY2 OX φυτών αν και είναι και αυτές πιο πυκνές, δεν εμφανίζουν μεγαλύτερο μήκος από τα control και, έχοντας ίδιο απόλυτο αριθμό φυματίων με αυτά, διαθέτουν μικρότερο αριθμό φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας, υποδηλώνοντας περιορισμένη φυματιόγνεση έναντι των control. Τέλος, τόσο η μορφολογία των φυματίων όσο και του βλαστού ήταν κοινή με τα φυτά ελέγχου. Ενδεικτικές εικόνες των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των controls, Low AMY2 OX φυτών και High AMY2 OX φυτών, παρατίθενται στην εικόνα 22.



ΕΙΚΟΝΑ 22: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες απεικόνισης των μορφολογικών χαρακτηριστικών φυτών: Α) ελέγχου(CONTROL), Β) φυτών με χαμηλή υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2*(LOW AMY2 OX) και Γ) φυτών με τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2*(HIGH AMY2 OX). Από πάνω προς τα κάτω οι επιμέρους εικόνες δείχνουν ολόκληρο το φυτό , το σύνολο της ρίζας, ριζικό ιστό με φυμάτια κάτω από το στερεοσκόπιο με μεγέθυνση 0,8X και φυμάτια στο στερεοσκόπιο με μεγέθυνση 2,5X.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η υπερέκφραση του γονιδίου *LjAMY2* στο μοντέλο φυτό *Lotus japonicus* και η επακόλουθη διερεύνηση της επίδρασης του, στη διαδικασία της φυματιογένεσης, έπειτα από την μόλυνση αυτού με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*.

Χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές κλωνοποίησης και την τεχνολογία Gateway κατασκευάστηκε ο φορέας υπερέκφρασης *pUB-GW-Hyg:AMY2* με τον οποίο μετασχηματίστηκαν τα φυτά υπερέκφρασης (*AMY2* φυτά). Τα φυτά ελέγχου μετασχηματίστηκαν με τον άδειο φορέα *pUB-GW-Hyg*. Προέκυψαν θετικά μετασχηματισμένα φυτά *AMY2* και *control* με ποσοστό μετασχηματισμού 98,5% (66/67) και 98% (49/50) αντίστοιχα. 21 ημέρες μετά τη μόλυνση με *M. loti*, μέχρι το σχηματισμό ώριμων φυματίων, έγινε καταγραφή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω RT-qPCR.

Τα 23 από τα 24 *AMY2* φυτά που ελέγχθηκαν (95,8%) εμφάνιζαν πρότυπο υπερέκφρασης. Καθοριστικό παράγοντα για αυτό το πολύ μεγάλο ποσοστό υπερέκφρασης, φαίνεται πως αποτέλεσε ο υποκινητής του γονιδίου της ουβικουιτίνης του φυτού *Lotus japonicus* (*UB500i promoter*) που χρησιμοποιήθηκε (Maekawa *et al.*, 2008) για την έκφραση του γονιδίου *AMY2*, διότι, προηγούμενες προσπάθειες υπερέκφρασης του γονιδίου, στο ίδιο φυτό, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών και Περιβάλλοντος, με χρήση του υποκινητή *CAMV 35S* οδήγησαν σε περιορισμένη υπερέκφραση σε μικρό αριθμό φυτών. Η περιορισμένη υπερέκφραση ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι επειδή ο *CAMV 35S* είναι ιικός υποκινητής, μπορεί να υπόκειται σε άντι-ιικούς ελέγχους που αναπτύσσονται από τα φυτά (σε αντίθεση με τον υποκινητή *UB500i* ο οποίος έχει φυτική προέλευση) ή μπορεί επειδή είναι ισχυρός, να παράξει μεγάλες ποσότητες RNA οδηγώντας σε μεταγραφική σίγηση (Matzke & Matzke, 1995). Ακόμα η πολυμεράση του *L. japonicus* μπορεί να μην αναγνωρίζει πολύ καλά αυτόν τον υποκινητή οδηγώντας έτσι σε μειωμένη έκφραση του διαγονιδίου.

Η ανάλυση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταξύ των φυτών ελέγχου ($n=44$) και όλων ($n=23$) των φυτών υπερέκφρασης (*AMY2 OX*) έδειξε ότι στα *AMY2 OX* φυτά υπάρχει στατιστικά πολύ σημαντική αύξηση του βάρους της ρίζας, σχεδόν διπλάσια του φυσιολογικού, συγκριτικά με τα *control* ενώ διέθεταν επίσης και μικρότερο αριθμό φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας.

Ωστόσο, παρατηρήθηκαν 2 διαφορετικά πρότυπα υπερέκφρασης μεταξύ των φυτών *AMY2 OX*: τα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση (*Low AMY2 OX*) και τα φυτά με τεράστια υπερέκφραση (*High AMY2 OX*).

Η τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου στα *High AMY2 OX* φυτά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αν και υπό φυσιολογικές συνθήκες το γονίδιο *LjAMY2* εκφράζεται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα της ρίζας και των φυματίων

(Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003; Sawai *et al.*, 2006), ο υποκινητής της ουβικουιτίνης που χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση του γονιδίου, είναι πολύ ισχυρός και εκφράζεται σ' όλα τα κύτταρα (Maekawa *et al.*, 2008). Αυτό σε συνδυασμό με την ενσωμάτωση του T-DNA σε μια μεταγραφικά ενεργή περιοχή θα μπορούσε να οδηγήσει σε τεράστια υπερέκφραση. Σε αντίθεση, η κατά πολύ χαμηλότερη έκφραση στα Low AMY2 OX φυτά μπορεί να οφείλεται σε ενσωμάτωση του T-DNA σε περιοχή με μικρή μεταγραφική ενεργότητα.

Πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή φαινοτυπική σύγκριση κάθε ομάδας με τα φυτά control για να διαπιστωθεί αν αυτές οι δύο συμπεριφέρονται ανεξάρτητα ή παρόμοια, όσον αφορά το φαινοτυπικό τους προφίλ.

Από την στατιστική ανάλυση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, προέκυψε ότι τα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση (Low AMY2 OX) διέθεταν, πιο μακριά και διακλαδισμένη ρίζα με ίδιο αριθμό φυματίων ανά γραμμάριο ρίζας σε σχέση με τα φυτά ελέγχου προτείνοντας την ύπαρξη ενός φαινοτύπου ρίζας. Από την άλλη, τα φυτά με τεράστια υπερέκφραση του γονιδίου AMY2 (High AMY2 OX), χαρακτηρίζονταν από την ύπαρξη πιο διακλαδισμένων ριζών, με μικρότερο όμως αριθμό φυματίων συγκριτικά με το βάρος της ρίζας ως προς τα φυτά ελέγχου. Παρατηρήθηκε συνεπώς, ότι τα Low AMY2 OX και τα High AMY2 OX εμφάνισαν διαφορετικό φαινότυπο.

Για την ερμηνεία του φαινοτύπου των Low AMY2 OX συγκριτικά με τα φυτά ελέγχου μπορούν να γίνουν διάφορες υποθέσεις.

Το γονίδιο *LjAMY2* κωδικοποιεί για μια συνθάση μικτής δράσης, η οποία παράγει την β-αμυρίνη και ένα παράγωγο της λουπεόλης. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται έντονα στις ρίζες του μοντέλου-ψυχανθούς *Lotus japonicus* και σε φυμάτια που σχηματίζονται ύστερα από μόλυνση με το συμβιωτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti*. Κάθε μία από τις 2 ενώσεις που συντίθενται μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την παραγωγή ποικίλων μεταβολιτών των οποίων οι λειτουργίες δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί. Μία υπόθεση είναι, ότι οι διάφοροι μεταβολίτες που παράγονται σε περαιτέρω βιοχημικά μονοπάτια αναπτύσσουν διαφορετικούς ρόλους και ο καθένας συμμετέχει στη ρύθμιση συγκεκριμένης αναπτυξιακής και αυξητικής διαδικασίας.

Στην προκειμένη περίπτωση, οι αναπτυξιακές και αυξητικές διαδικασίες που υφίστανται μεταβολή είναι: η αύξηση του μήκους της ρίζας, η αύξηση της πυκνότητας της ρίζας, όπου η ρίζα μέσω του κατάλληλου σήματος δίνει εντολή στα μεριστωματικά κύτταρα να αρχίσουν να διαιρούνται προς παραγωγή διακλαδώσεων, και η διαδικασία ανάπτυξης των φυματίων, χαρακτηριστικών δομών με ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά.

Συνεπώς, μπορεί ένα μόριο να ρυθμίζει την αύξηση της ρίζας, ένα την ανάπτυξη διακλαδώσεων και ένα άλλο τον συνολικό αριθμό των φυματίων, που παρατηρούνται να είναι σημαντικά αυξημένα έναντι των controls. Εναλλακτικά, ένα

μόριο μπορεί να επηρεάζει την ρίζα και ένα άλλο τη φυματιογένεση. Σε άλλη περίπτωση θα μπορούσε όλες οι αλλαγές μεταξύ των φυτών να οφείλονται στην δράση μιας μόνο ουσίας.

Το καταλυτικό μόριο για την αύξηση του αριθμού των φυματίων θα μπορούσε να είναι κάποια ή κάποιες σαπωνίνες που προέρχονται από την β-αμυρίνη. Κάτι αντίστοιχο αντανakλάται και από τα αποτελέσματα της δημοσίευσης των Confalonieri *et al.* (2009) όπου η ετερόλογη έκφραση της AsOXA1 (συνθάση β-αμυρίνης του φυτού *Aster sedifolius*) στο *M. truncatula* είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων σαπωνενινών, προερχόμενων από την β-αμυρίνη, στα φύλλα, τις ρίζες και τα φυμάτια του διαγονιδιακού φυτού, το οποίο εμφάνισε αύξηση του αριθμού των φυματίων του σε σχέση με τα φυτά ελέγχου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης αναφέρονται σε ένα μόνο φυτό συγκριτικά με φυτά ελέγχου, στο οποίο έγινε μεταβολική ανάλυση των σαπωνενινών που περιέχει. Ακόμα, έχει προταθεί ότι, η β-αμυρίνη, είναι δομικό συστατικό της μεμβράνης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αύξησης και ανάπτυξης στα ψυχανθή και η σύνθεση της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της δημιουργίας ριζόβιων και μυκορριζικών συμβιωτικών σχέσεων (Baisted, 1971; Hernandez & Cooke, 1996; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003).

Η β-αμυρίνη εκτός από την εμπλοκή της στη φυματιογένεση φαίνεται πως διαθέτει πολύ περισσότερες λειτουργίες. Στη βρώμη, η αυξημένη περιεκτικότητα σε β-αμυρίνη στις ρίζες έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα βραχύτερες ρίζες με έναν έντονο φαινότυπο “Hairy roots”, καθιστώντας τις πολύ πιο διακλαδισμένες από τα control (Kemen *et al.*, 2014). Κατά την έρευνα των Kemen *et al.* (2014), η συσσώρευση υψηλών επιπέδων β-αμυρίνης προκαλεί μια αλλαγή στη μοίρα των κυττάρων στην επιδερμίδα της ρίζας, με περισσότερα κύτταρα να καθορίζονται ως τριχοβλάστες (κύτταρα που δημιουργούν τα ριζικά τριχίδια). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ένας σαφής δεσμός μεταξύ του μήκους της ρίζας και της ποσότητας της β-αμυρίνης που συσσωρεύεται στις ρίζες, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση αυξημένων επιπέδων β-αμυρίνης πυροδοτεί αλλαγές στον κυτταρικό προσδιορισμό και στο μήκος της ρίζας (Moses *et al.*, 2014).

Από όλα τα παραπάνω επιστημονικά ευρήματα εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι η αύξηση των επιπέδων της β-αμυρίνης, θα μπορούσε να εξηγήσει σε σημαντικό βαθμό, όλες τις φαινοτυπικές διαφορές (αύξηση μήκους, βάρους ρίζας και απόλυτου αριθμού φυματίων) που παρατηρούνται μεταξύ των Low AMY2 OX φυτών και των control, αλλά το πιο πιθανόν είναι να δρα σε συνεργασία με άλλα σηματοδοτικά μόρια, ωστόσο, ο μηχανισμός ή μηχανισμοί μέσω των οποίων προκαλεί αυτές τις επιδράσεις παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Στην περίπτωση, τώρα, των High AMY2 OX φυτών παρατηρείται μεν αύξηση του βάρους της ρίζας αλλά μείωση του αριθμού των φυματίων ανά γραμμάριο αυτής,

με τον συνολικό αριθμό των φυματίων να παραμένει σταθερός και να μην αυξάνεται όπως στα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση.

Προτεινόμενο μοντέλο εξήγησης των παραπάνω φαινοτυπικών αποκλίσεων θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη κάποιου μορίου που σε δεδομένη συγκέντρωση επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία και όταν αυτή μεταβληθεί, π.χ. αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό να επιτελεί κάποια άλλη, ή να σταματήσει να επιτελεί την αρχική δηλαδή, να υπάρχει, μια ισορροπία συγκέντρωσης που όταν διαταραχθεί να επιφέρει ανάλογες λειτουργικές και φαινοτυπικές συνέπειες.

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η λουπεόλη εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση των πρώιμων διαδικασιών της φυματογένεσης στο φυτό *Lotus japonicus* (Delis *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του *ENOD40*, ενός γονιδίου δείκτη απαραίτητου για την διαδικασία της φυματογένεσης, αυξήθηκε σημαντικά σε φυτά με σίγηση του γονιδίου *OSC3* (συνθάση της λουπεόλης), υποδηλώνοντας ότι η λουπεόλη επηρεάζει το σχηματισμό των φυματίων. Σύμφωνα με τους Delis *et al.* (2011), το μοντέλο έκφρασης του γονιδίου *OSC3* μπορεί να προτείνει ένα δομικό ρόλο για τη λουπεόλη στη μεμβράνη των αναπτυσσόμενων φυματίων ή/και ενός ρόλου στη μεταφορά των ενώσεων εντός και εκτός αυτών.

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη ότι η λουπεόλη παράγεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες από την β-αμυρίνη, θα μπορούσε η υπερέκφραση της β-αμυρίνης στα Low AMY2 OX φυτά να προκαλεί αύξηση της φυματογένεσης όταν η ποσότητα της λουπεόλης δεν είναι τόσο μεγάλη, αλλά όταν αυτή ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο (ισορροπία συγκέντρωσης) να προκαλεί καταστολή αυτής, λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του γονιδίου *ENOD40*.

Επίσης, μπορεί η υπερέκφραση του γονιδίου σε τόσες μεγάλες ποσότητες να οδηγεί σε μέτα-μεταγραφική σίγηση, προκαλώντας μια επακόλουθη μείωση σχηματισμού κάποιου παραγόμενου μεταβολίτη εμπλεκόμενου στο σχηματισμό φυματίων και άρα μείωση του αριθμού αυτών στο φυτό.

Όλα όσα προαναφέρθηκαν αποτελούν φυσικά υποθέσεις αφού ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *LjAMY2* πραγματοποιήθηκε σε μεταγραφικό και όχι σε μεταβολικό επίπεδο.

Μελλοντικά, πειράματα που μπορούν να διεξαχθούν είναι η επανάληψη και άλλων τεχνικών επαναλήψεων του πειράματος για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και η ανάλυση του μεταβολικού περιεχομένου των φυτών με υπερέκφραση για να διαπιστωθεί αν όντως τα παράγωγα της β-αμυρίνης καθώς και του μεγάλου φάσματος των μεταβολιτών που προέρχονται από αυτά, αυξάνονται σε ποσότητα, και αν ναι, πως διαφέρει αυτή μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων φυτών υπερέκφρασης και των φυτών ελέγχου, και πως ερμηνεύονται βάση αυτών οι φαινοτυπικές αποκλίσεις που ανιχνεύονται

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe I. (2007). Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Natural Product Reports*, 24, 1311–31
2. Abe, I., Rohmer, M., & Prestwich, G. D. (1993). Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes, *Chemical Reviews*. 93, 2189 -2206.
3. Abe, I., Sakano, Y., Sodeyama, M., Tanaka, H., Noguchi, H., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2004a). Mechanism and stereochemistry of enzymatic cyclization of 24,30-bisnor-2,3-oxidosqualene by recombinant β -amyrin synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6880–81.
4. Abe, I., Sakano, Y., Tanaka, H., Lou, W., Noguchi H., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2004b). Enzymatic cyclization of 22,23-dihydro- 2,3-oxidosqualene into euph-7-en-3 β -ol and bacchar-12-en-3 β -ol by recombinant β -amyrin synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3426–27.
5. Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R.F., Bizzo, H.R., Silveira, D., & Gimenes, M.A. (1996). Secondary metabolites. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biological Sciences, 104, 225–242.
6. Agrell, J., Oleszek, W., Stochmal, A., Olsen, M., Anderson, P. (2003). Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Chemical Ecology*, 29, 303–320.
7. Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S., Yamanouchi, S., & Tamura, T. (1997). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 2016-2023.
8. Baisted, D.J. (1971). Sterol and triterpene synthesis in developing and germinating pea seed. *Biochemical Journal*, 124, 375–383.
9. Banba, M., Siddique, A., Kouchi, H., & Izui, K., & Hata, S. (2001). *Lotus japonicus* Forms Early Senescent Root Nodules with *Rhizobium etli*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 14, 173-80.
10. Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711–8721.
11. Bouvier, F., Rahier, A., & Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research*, 44(6), 357–429.
12. Boycheva, S., Daviet, L., Wolfender, J.L., & Fitzpatrick, T.B. (2014). The rise of operon-like gene clusters in plants. *Trends in plant science*, 19(7), 447-59.

13. Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol *origami*. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 151–57.
14. Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1–20.
15. Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbert, F., & Tempe, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295, 432-434.
16. Chu, H.Y., Wegel, E., & Osbourn, A. (2011). From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *Plant J*, 66(1), 66-79.
17. Confalonieri, M., Cammareri, M., Biazzi, E., Pecchia, P., Pedro, M., Fevereiro, S., Balestrazzi, A., Tava, A., & Conicella, C., (2009). Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (*AsOXA1*) gene. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 172–182.
18. Constantino, P., Spano, L., Pomponi, M., Benvenuto, E. & Ancora, G. (1984). The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to the progeny of hairy root plantlets. *Journal of Molecular Applied Genetics*, 2, 465-470.
19. Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., & Wang, Z.Y. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*, 223, 1344–1354.
20. David, C., Chilton, M.D., & Tempe, J. (1984). Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Bio/Technology*. 2, 73-76.
21. Delis, C., Krokida, A., Georgiou, S., Peña-Rodríguez, L., Kavroulakis, N., Ioannou, E., Roussis, V., Osbourn, A., & Papadopoulou, K., (2011). Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *The New phytologist*. 189. 335-46.
22. Diaz, C.L., Melchers, L.S. Hooyakas, P.J.J., Lugtenverg, B.J.J., & Kijne, J.W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in *Rhizobium* legume symbiosis. *Nature*, 338, 579-581.
23. Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T.J., & Rohmer, M. (1998). Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in *tobacco* BY-2 cells. *Biochemical Journal*, 331, 615–621

24. Dixon R.A. & Sumner L.W. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology*, 131, 878–885.
25. Engelberth, J. E., (2013). Δευτερογενείς μεταβολίτες και φυσική άμυνα (Κ. Μ. Κουκ & Θ. Λαναράς, μετάφραση). Στο Μ. Σ. Μελετίου-Χρήστου (Επιμ. κεφ.) & Κ. Α. Θάνος (Γεν. επιμ.), *Φυσιολογία φυτών* (1^η ανατύπωση 1^{ης} έκδοσης, σελ 444-449). Αθήνα: Εκδόσεις Utopia (Το πρωτότυπο έργο δημοσιεύτηκε το 2010).
26. Fernández, M.A., de las Heras, B., García, M.D., Sáenz, M.T., & Villar, A. (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol*, 53, 1533–1539.
27. Fraenkel, G. S., (1959). The Raison d ' Etre Substances of Secondary Plant. *Science*, 129(i), 1466–1470.
28. Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., & Gierl, A. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 277, 696–699.
29. Garg, N., & Manchanda, G. (2007). Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Process and Signaling: A Review.
30. Gordon, A.J., Thomas, B.J., & Reynolds, P.H.S. (1992). Localization of sucrose synthase in soybean root nodules. *New Phytol*, 122, 35–44.
31. Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F., & Sancholle, M., (1999). Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*, 50, 1027–1031.
32. Gustavo, A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R., & Ayra-Pardo, C. (1998). The *agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell. *Electronic Journal of Biotechnology*.
33. Hadri, A.E. & Bisseling, T. (1998). Responses of the plant to Nod factors. In H.P. Spaink, Kondorosi A. and Hooykaas P.J.J. (Eds.), *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria*. (pp. 403-416). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
34. Handberg, K. & Stougaard, J. (1992). *Lotus japonicus*, an Autogamous, Diploid Legume Species for Classical and Molecular-Genetics. *Plant Journal*, 2, 487–496.
35. Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R., & Osbourn, A. (2001). A new class of oxidosqualene cyclases directs

synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98, 13431-13436.

36. Haralampidis, K., Trojanowska, M., & Osbourn, A. E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 75, 31–49.

37. Harborne, J.B. (1991). Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In J.B. Harborne and F.A. Tomas-Barberan (Eds), *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* (pp. 399-426). Oxford: Clarendon Press.

38. Harborne, J.B. (1999) Classes and functions of secondary products from plants. In *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Edited by Walton, N.J. and Brown, D.E. pp. 1–25. Imperial College Press, London.

39. Hayashi, H., Huang, P., Takada, S., Obinata, M., Inoue, K., Shibuya, M., Ebizuka, Y. (2004). Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol Pharm Bull*, 27, 1086-1092.

40. Hernandez, L.E., & Cooke, D.T. (1996). Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry*, 42, 341–346.

41. Holstein, S.A. & Hohl, R.J. 2004. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids*, 39(4), 293–309.

42. Hou, Q., Wang, K., Xu, F., Zhang, W., Ji, K., & Liu, Y. (2017). QM/MM studies of the type II isopentenyl diphosphate-dimethylallyl diphosphate isomerase demonstrate a novel role for the flavin coenzyme. *RSC Advances*, 7(36), 22286–22293.

43. Hu, Z., & Du, Min. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48. 121 - 127.

44. Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K., & Osbourn, A.E. (2003). Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*, 51, 731-743.

45. Jenner, H., Townsend, B., & Osbourn, A. (2005). Unravelling triterpene glycoside synthesis in plants: Phytochemistry and functional genomics join forces. *Planta*, 220(4), 503–506.

46. Jiang, Q., & Gresshoff, P.M. (1993). *Lotus japonicus*: A model plant for structure-function analysis in nodulation and nitrogen fixation. In P.M. Gresshoff (Ed.), *Current Topics of Plant Molecular Biology II* (pp. 97-110), , FL, Boca Raton: CRC Press.

47. Kahn, M.L., McDermott, T.R., & Udvardi, M. (1998). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. In H.P. Spink, Kondorosi A. and Hooykaas

P.J.J. (Eds.), *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria*. (pp. 461-485). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

48. Kemen A. C., Honkanen S., Melton R.E., Findlay K.C., Mugford S.T., Hayashi K., Haralampidis K., Rosser S.J., & Osbourn A. (2014). Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning, *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(23), 8679-84.

49. Kim, Y., Weathers, P.J., & Wyslouzil, B.E. (2002b) Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas-phase reactors. *Biotechnol Bioeng*. 80(4), 454–464.

50. Kim, Y., Wyslouzil, B.E., & Weathers, P.J. (2002a). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Dev Plant*, 38, 1–10.

51. Krokida, A., Delis, C., Geisler, K., Garagounis, C., Tsikou, D., Peña-Rodríguez, L., Katsarou, D., Field, B., Osbourn, A., & Papadopoulou, K.,. (2013). A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *The New phytologist*. 200, 675–690.

52. Lee, T.K., Poon, R.T., Wo, J.Y., Ma, S., Guan, X.Y., Myers J.N., Altevogt, P., & Yuen, A. P.W. (2007). Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res.* , 67, 8800–8809.

53. Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 47–65.

54. Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., & Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643–652.

55. Liu, Y., Wang, H., Ye, H. C., & Li, G. F. (2005). Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(7), 769–782.

56. Long ,S.R. (1989). *Rhizobium* – legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56, 203-14.

57. Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y., & Hayashi, M. (2008). Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in *Lotus japonicus*, 21(4), 375–382.

58. Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J., (1996). *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 15, 113-140.
59. Matzke M. A., & Matzke A. J. M. (1995). How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes?, *Plant Physiol*, 107(3), 679-685.
60. McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015–1026.
61. Miyagawa, H. (2009). Studies on nitrogen-containing secondary metabolites playing a defensive role in plants. *Journal of Pesticide Science*, 34(2), 110–112.
62. Moses T., Papadopoulou K., & Osbourn A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49(6), 439–462.
63. Newman, J. D., & Chappell, J. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(2), 95–106.
64. Oldroyd, G., & Harrison, M., & Udvardi, M. (2005). Peace Talks and Trade Deals. Keys to Long-Term Harmony in Legume-Microbe Symbioses. *Plant physiology*. 137. 1205-10.
65. Osbourn, A. (1996). Saponins and plant defence - a soap story, *Trends in Plant Science*, 1(1), 4–9.
66. Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in genetics*, 26(10), 449-57.
67. Otuki M.F., Ferreira M., Lima F.V., Meyre-Silva C., Malheiros A., Muller L.A., Cani G.S., Santos A.R.S., Yunes R.A. & Calixto J.B. (2005). Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *JPET*, 313, 310–318.
68. Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293–304.
69. Page, J. E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W., Zenk, M. H., Schmidt, J., & Kutchan, T. M. (2004). Functional Analysis of the Final Steps of the 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) Pathway to Isoprenoids in Plants Using Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Physiology*, 134, 1401-1413.

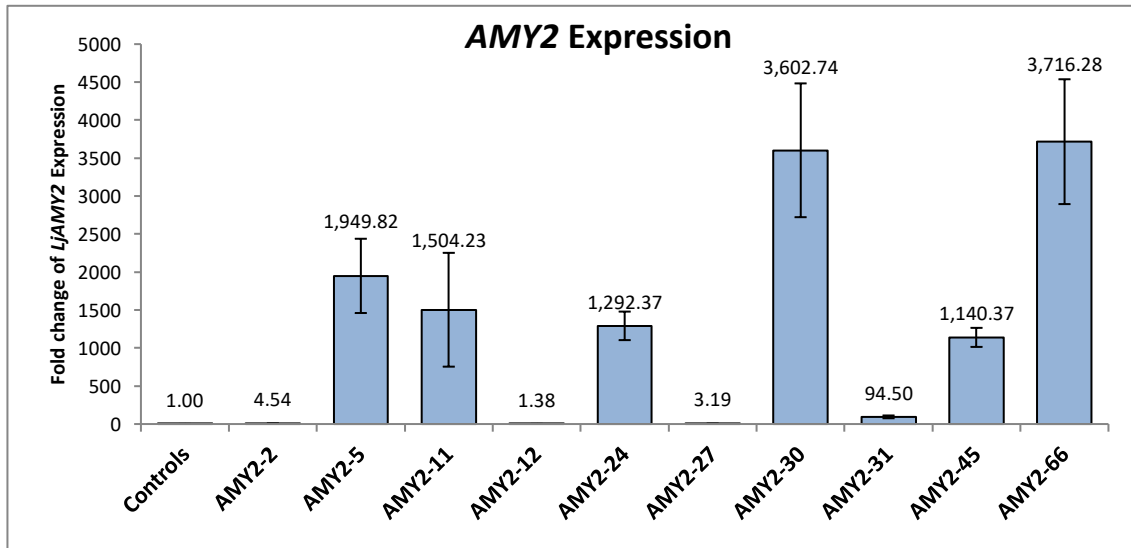
70. Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., & Osbourn, A.E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12923–12928.
71. Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Barte, I. B., and Matsuda S.P.T. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 305–314.
72. Pulido, P., Perello, C., & Rodriguez-Concepcion, M. (2012). New insights into plant Isoprenoid metabolism. *Molecular Plant*, 5(5), 964–967.
73. Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R., & Osbourn, A. (2004). A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8233–8238.
74. Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N., & Tsurumi, S. (2001). Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant physiology*, 125(2), 990–1000.
75. Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, 130(3), 1079–1089.
76. Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Ferrer, A., & Boronat, A. (2013). Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in *Arabidopsis*. In T. J. Bach & M. Rohmer (Eds.), *Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches* (pp. 439–456). New York, NY: Springer.
77. Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 357–358.
78. Sacchettini, J. C., & Poulter, C. D. (1997). Creating Isoprenoid Diversity. *Science*, 277, 1788–1789.
79. Saleem M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters*, 285(2), 109–115.
80. Samy R.P. & Gopalakrishnakone P. (2008). Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *eCAM Advance Access*, 36, 1–12.
81. Sapir-Mir, M., Mett, A., Belausov, E., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Gidoni, D., & Eya, Y. (2008). Peroxisomal localization of arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology*, 148(3), 1219–1228.

82. Sawai, S., & Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1–8.
83. Sawai, S., Shindo, T., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Ayabe, S., & Aoki, T. (2006). Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170, 247–25.
84. Sinkar, V.P., White, F.F. & Gordon, M. P. (1987). Molecular biology of Ri plasmid—A review. *Journal of Biosciences*, 11, 47–57.
85. Stougaard, J.,(2017). *Lotus japonicus*: A Model Plant for the Legume Family.
86. Sudharsan, P.T, Mythili, Y., Selvakumar, E., Varalakshmi, P. (2006). Lupeol and its ester exhibit protective role against cyclophosphamide-induced cardiac mitochondrial toxicity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 47, 205–210.
87. Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K., & Ageta, H. (1999). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 22, 606–610.
88. Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37, 959–967.
89. Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O’Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
90. Tholl D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: J. Schrader and J. Bohlmann (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (vol 148, pp. 63–106). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
91. Tiwari, R., & Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3, 661–670.
92. Udvardi, M., & Day, David. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48, 493–523.
93. Udvardi, M., & Poole, P. (2013). Transport and Metabolism in Legume-*Rhizobia* Symbioses. *Annual review of plant biology*, 64(1), 781–805.
94. Udvardi, M., Tabata, S., Parniske, M., & Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science*. 10, 222–228.
95. Verpoorte R. (2000). Secondary Metabolism. In R. Verpoorte & A.W. Alfermann (Eds), *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (pp. 1–29). Dordrecht: Springer.

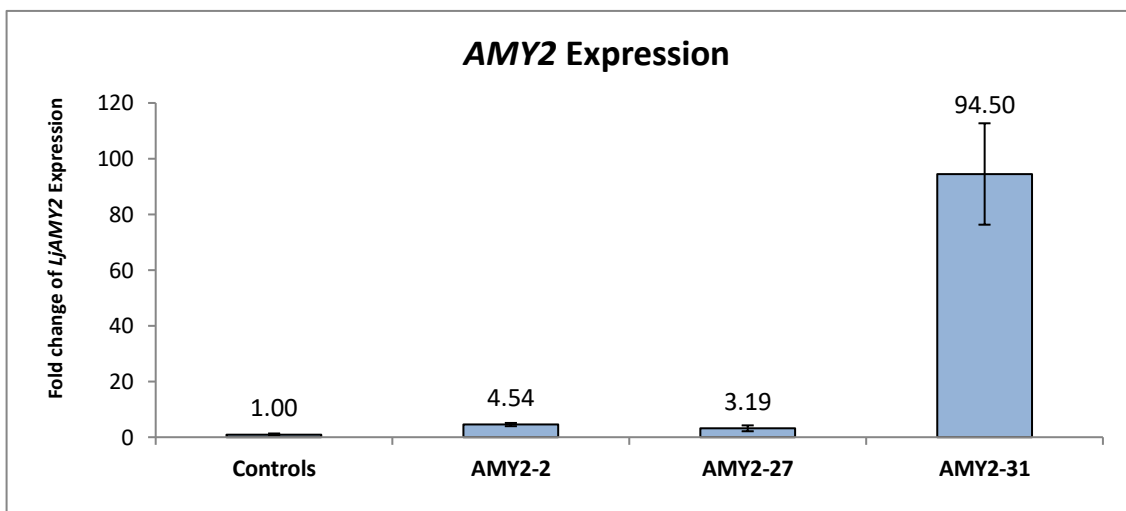
96. Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275–297.
97. Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Molecular Plant*, 5(2), 318–333.
98. Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1984). Right 25 bp terminus sequences of the nopaline T-DNA is essentially for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, 38, 455-462.
99. Wendt, K. (2005). Enzyme Mechanisms for Triterpene Cyclization: New Pieces of the Puzzle. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 44(26), 3966-71.
100. White, F.F., Taylor B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P., & Nester, E.W. (1985). Molecular and Genetic Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root- Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164, 33-44.
101. White, J., Prell J., James E.K. & Poole, P. (2007). Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.*, 144, 604-614.
102. Xu, R., Fazio, G.C., & Matsuda, S.P. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Διαγράμματα



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε ορισμένα από τα φυτά με υπερέκφραση που ανιχνεύθηκαν, με εξαίρεση το φυτό AMY2-12 που έχει φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με τα φυτά control, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR. Για τα control φυτά παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση τριών βιολογικών δειγμάτων ($n=3$), για τα υπόλοιπα ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση δύο τεχνικών επαναλήψεων της RT-qPCR.

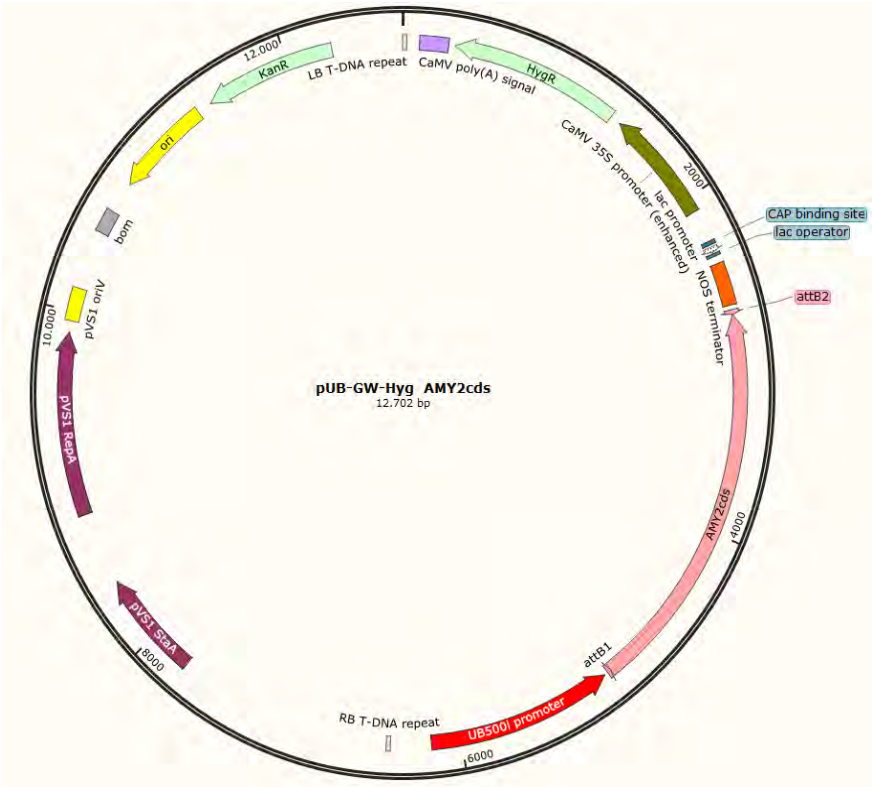


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε ορισμένα από τα φυτά με χαμηλή υπερέκφραση που ανιχνεύθηκαν σε σύγκριση με τα φυτά control, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR. Για τα control φυτά παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση τριών βιολογικών δειγμάτων ($n=3$), για τα υπόλοιπα ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση δύο τεχνικών επαναλήψεων της RT-qPCR.

6.2 Κωδική αλληλουχία γονιδίου *AMY2*

>gb|AF478455.1|:12-2300 *Lotus japonicus* multifunctional beta-amyrin synthase (*AMY2*) mRNA, complete cds:

```
ATGTGGAAGCTGAAGGTAGCAGATGGTGGCAAGAATCCTTACATATTCAGCATCAAC
AACTTCGTGGGAAGGCAGACATGGGAGTATGATCCTGATGCAGGTACTCCTGAGGAA
CGAGCTCAGGTTGAAGAAGCTCGTCAGGATTTCTATAACAACCGCTACAAGGTCAAG
ACTTGTGGCGACCGACTTTGGCGGTTTCAGGTTATGAGGGAAAATAACTTCAAACAA
ACAATACCGAGTGTGAAGATAGAGGATGGAGAGAAGGTAACATACGATAAAGTGACA
ACAAGTGTGAGAAGGGCCGCACATCACCTAGCAGGATTACAGACCAGTGATGGCCAT
TGGCCTGCTCAAATTGCTGGTCCCTCTGCTTTTCACGCCTCCCTTGATCTTTTGTATG
TACATAACAGGTCATCTTGATTCTGTATTCCCAGAAGTGTACCGCAAAGAGATTCTT
CGTTACACATACGTTTCATCAGAATGAAGATGGAGGGTGGGGACTACACATAGAGGGT
CATAGCACCATGTTTTGTACTGTACTCAACTACATATGCATGCGAATACTTGAGAGAA
GGACCTGATGGAGGTCAAGACAATGCTTGTGCAAGAGCAAGAAAATGGATTTCATGAT
CATGGGGGCGCGACACACATAGCTTCTTGGGGGAAGACATGGCTTTCGATACTTGGT
ATATTTGATTGGAGCGGAACCAATCCAATGCCTCCAGAATTTTGGATCCTTCCTTCA
TTTCTTCCTATGCATCCAGCTAAAATGTGGTGTATTGCCGATTGGTGTACATGCCT
ATGTCTTACTTGTATGGGAAGAGATTTGTGGGTCCAATAACACCACTCATCTTACAG
TTGAGAGAAGAACTCTTTACTCAACCTTATGAAAAAGTTAATTGGAAGAAGGCACGT
CATCAATGTGCAAAGGAAGATCTTTACTATCCTCATCCTTTGATACAAGACTTGATG
TGGGATAGTTTATACCTATTCAGTGCATTCCTTGACTCGTTGGCCTTTCACAACAG
CTGATCAGAGAAAGAGCCCTTCAAGTAACAATGAAACATATCCATTATGAAGATCAT
AATAGTCGATACATTACCATTGGGTGCGTGGAAAAGGTTTTATGCATGCTTGCTTGT
TGGGTGGAAGATCCGAACGGAATTGCTTTCAGAGACATCTTGCCAGGGTCCCGGAT
TACTTGTGGCTTGCAGAAGATGGAATGTGCATGCAGAGTTTTGGTAGCCAAGAATGG
GATGCTGGTTTTCGCCGTTCAAGCTCTGCTTTCTACTAACCTAATTGACGAACTCGGT
CCCGCACTTGCAAAAGGACATGATTTTATCAAGAATTCTCAGGTTAAGGACAACCCT
TCAGGAGATTTTAAGAGTATGCATCGCCATATTTCCAAAGGAGCATGGACCTTTTCT
GATCAAGACCATGGATGGCAAGTTTCTGATTGCACTGCAGAAGGTTTTAAGTGTGT
CTACTTTTGTCAATGTTGCCTCCAGAGATTGTAGGGGAAAAGATAGAGCCTGAAAGG
TTATTCGATACTGTCAATCTCCTATTGTCACTTCAGAGTAAAAAGGGTGGTTTTTGCA
GTATGGGAGCCAGCAGGAGCTCAGGAGTGGCTGGAAGTCAATCCCATAGAATTT
TTTGAGGACATTGTAATTGAGCATGAATTGGTTGAGTGCAGTGGATCAGCAATTGGA
GCCTTAGTTTTTGTTCAGAATCATTATCCAGAGCATAGAAAGAAAGAGATCGAGGAT
TGCATTGCTAATGCAGTTTCGTTACTTTGAAGATATACAAACAGCAGATGGTTCTTGG
TATGGAAATGCAGGAATTTGCTTCATTTATGGTACTTGGTTTGCAGTTGGTGGTCTA
GAAGCAGCTGGCAAACTTATGCCAATTGTGCTGCCATTTCGCAAAGGTGTTAAATTT
CTACTCACGACACAATCAAAGGATGGTGGGTGGGGAGAGAGTTATCTATCATGCCCA
AAAAAGATATATGTACCTCTTGAAGGAAACCGATCAAATGTTGTACAGACAGCATGG
GCTCTTATGGGTTTGATTTCATGCTGGCCAGGCGGAGAGAGACCCTACTCCACTTCAC
CGTGCTGCAAAATTGCTCATCAATTCTCAGCTTGAAGATGGTGATTGGCCCCAACAG
GATATTACTGGAGTATACGTGAAAAATTGCACGCTGCATTACCCAATGTACAGAAAT
AATTTTACAACGATGGCCCTAGCTGAATATCGTCGACGGGTTCATTACCATCCATT
GCAGTTTAA
```



6.4 Θρεπτικά διαλύματα

Θρεπτικό διάλυμα ποτίσματος Hoaglands χωρίς άζωτο (-N):

ΔΙΑΛΥΜΑ	Σ ΑΡΧΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ(ml/l) ΣΕ ΤΕΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ 1L
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
Fe – EDTA	0,1M	1
Microelements	*	1
CaCl ₂	0,5M	10
KCl	1M	5

* Microelements stock solution

Microelement	gr/l
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ H ₂ O	0,05
H ₂ MoO ₄	0,02

Θρεπτικό υλικό βακτηριακής ανάπτυξης LB.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΕ ΤΕΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ 200ml
NaCl	10g/l
Bacteriological Peptone	10g/L
Yeast extract	5g/L
Agar	15g/L

Θρεπτικό υλικό βακτηριακής ανάπτυξης YMB (Yeast Mannitol Broth).

ΔΙΑΛΥΜΑ	C (w/v)ΤΕΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
Mannitol	1%
K ₂ HPO ₄	0,05%
MgSO ₄	0,02%
NaCl	0,01%
Yeast extact	0,05%

